

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**COMPARAÇÃO DE DOIS PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO
DE CIO EM NOVILHAS DE RAÇA MERTOLENGA**

Gabriela Andrade de Freitas Dias

Orientador:

Prof. Doutor António Luís Mittermayer Madureira Rodrigues Rocha

Co-Orientadores:

Prof. Doutor Carlos Manuel Varela Bettencourt

Prof. Doutor João Nestor Chagas e Silva

Porto 2018

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**COMPARAÇÃO DE DOIS PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO
DE CIO EM NOVILHAS DE RAÇA MERTOLENGA**

Gabriela Andrade de Freitas Dias

Orientador:

Prof. Doutor António Luís Mittermayer Madureira Rodrigues Rocha

Co-Orientadores:

Prof. Doutor Carlos Manuel Varela Bettencourt

Prof. Doutor João Nestor Chagas e Silva

Porto 2018

RESUMO

A realização do estágio curricular, ao longo de 27 semanas, foi parcialmente realizado na Herdade da Abóbada (4 meses), em Serpa, focando-se principalmente na área de reprodução com objetivo de preservação de raças autóctones em bovinos, ovinos, caprinos e suínos. Os restantes 2 meses foram realizados na companhia de um Médico Veterinário, Doutorado, técnico superior da Faculdade de Medicina Veterinária em Lisboa, na área da reprodução de bovinos.

A combinação de ambos os estágios providenciou à autora ganhar experiência e conhecimento, vendo duas realidades diferentes, sendo que numa primeira foi mais apontada para a gestão e trabalho a ser realizado num centro de recolha e congelação de sémen, onde pôde ganhar confiança em todo o processo de recolha e congelação de sémen. Aqui, também pôde experienciar parte de clínica e sanidade que foram surgindo nas diversas espécies presentes na Herdade, nomeadamente bovinos, caprinos, ovinos e suínos.

No estágio realizado em Lisboa, a autora aprendeu e praticou uma metodologia de trabalho em reprodução de bovinos, maioritariamente de carne, sendo que foi acompanhando o supervisor nas explorações que requereram dos serviços de reprodução por parte dele. Aqui ganhou conhecimento, tanto a nível teórico como prático, das diversas técnicas reprodutivas realizadas em campo e, ainda, usufruiu da participação em 2 cursos da área de reprodução em bovinos.

Nos Anexos 1 e 2 expõe-se a casuística da autora em ambos os estágios.

AGRADECIMENTOS

Existem diversas pessoas que foram de extrema importância na concretização deste trabalho e consequente conclusão do curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Dito isto, a presente tese ficaria incompleta caso não registasse aqui os meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador, Professor Doutor Rocha, por me ter guiado quanto aos locais do meu estágio, sem tal não teria conseguido arranjar um estágio tão completo na área que pretendia. Agradeço também todo o apoio e disponibilidade que me foi demonstrado durante o tempo de estágio, assim como aquando da realização deste trabalho.

A todos os colaboradores da Herdade da Abóbada, por me terem recebido de braços abertos e me terem oferecido a possibilidade de ganhar prática e conhecimento num meio rodeado por tantas espécies de raças autóctones. Ao Professor Doutor Carlos Bettencourt, co-orientador, pela experiência que me forneceu, confiança que demonstra para com os seus orientandos e originalidade do tema que me propôs para realizar este trabalho. Agradeço também todos os momentos de convívio bem passados ao longo das diversas semanas. Dirijo também uns sinceros agradecimentos aos colegas que me acompanharam neste estágio, Catarina Linhares, Diogo Silva e Nuno Nunes, por todo o apoio e ajuda que me deram, principalmente na obtenção e registo de dados necessários para realizar este trabalho e, obviamente, por todos os momentos hilariantes que foram surgindo ao longo das semanas que passamos juntos.

Aos dirigentes da Associação de Criadores de Bovinos da Raça Mertolenga por se terem disponibilizado a ajudar com as inseminações, que foram de extrema importância para a realização deste trabalho. À professora Doutora Elisa Bettencourt pela ajuda na realização do diagnóstico de gestação das fêmeas sujeitas ao estudo e pela transmissão de informações que me foram de grande utilidade.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, por me ter autorizado a acompanhar o Professor Doutor com quem tive o privilégio de aprender imensamente sobre a área da reprodução, ao longo de 8 semanas. Agradeço então ao meu co-orientador, Professor Doutor Nestor Chagas, por toda a paciência que demonstrou em me fornecer o máximo possível de conhecimentos, tanto práticos como teóricos, em tão pouco tempo de estágio. Obrigada por me fazer entender a importância de se realizar todos os processos de forma mais metódica possível e por todos os conselhos referentes à tese e, também, à amizade que se foi formando ao longo destas semanas.

A toda a minha família, pais, avós, irmã e sobrinha, por todo o apoio que nunca me faltou, permitindo assim que eu continuasse a “queimar as pestanas” mesmo nos momentos em que achava que não iria conseguir finalizar esta etapa. Ao meu pai, por me mostrar como é necessário continuar sempre em frente e nunca desistir, mesmo quando as coisas não correm pelo melhor. À minha mãe, que sempre esteve presente e atenta a todos os passos que fui dando ao longo da minha vida académica e pessoal e que nunca se cansou de transmitir carinho e apoio a 100%. Sempre foram os que mais me apoiaram e que nunca deixaram de acreditar no meu sucesso, sendo que não tenho como não ficar imensamente agradecida.

A todos os meus amigos que me foram acompanhando ao longo do curso no ICBAS, sem vocês chegar a esta fase teria sido muito mais complicado. Obrigada Alice Silva, António Almeida, Bernardo Galriça, Catarina Garcia, Catarina Linhares, Daniel Borges, Diana Cavaleiro, Diogo Aires, Diogo Dias, Filipe Valente, Francisca Couto, Francisco Barbieri, Gil Oliveira, Gonçalo Bouças, Joana Santos, Joana Veiga, Luís Lopes, Maria João Brás, Mariana Lopes, Mariana Moniz, Marta Pelaez, Mónica Lameiro, e Rita Silva, por todos os momentos em que estiveram presentes quando era necessário eu desabafar, por toda a ajuda a nível académico e por todos os momentos de diversão e companheirismo que ficaram registados na minha memória.

Ao corpo docente do curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, por ser o pilar da minha formação.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

% - percentagem

< - menor que

> - maior que

χ^2 – Qui Quadrado

ACBM – Associação de Criadores de Raça Mertolenga

BRSV – vírus respiratório sincicial bovino

BVD – diarreia viral bovina

CC – condição corporal

CL – corpo lúteo

DG – diagnóstico de gestação

E2 – estradiol 17 β

eCG – gonadotropina coriônica equina

FSH – hormona folículo estimulante

g – grama(s)

GnRH – gonadoliberina

IA – inseminação artificial

IATF – inseminação a tempo fixo

IBR – rinotraqueíte infecciosa bovina

im – intramuscular

LG – livro genealógico

LH – hormona luteinizante

mL – mililitro(s)

ng – nanograma(s)

P1 – protocolo 1

P2 – protocolo 2

P4 – progesterona

PGF_{2 α} - prostaglandina F2alpha

RI – reflexo de imobilização

TAP – taxa de animais prontos para serem inseminados

TG – taxa de gestação

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	iv
1. A RAÇA BOVINA MERTOLENGA.....	1
2. PUBERDADE EM NOVILHAS.....	3
3. O CICLO ÉSTRICO DA FÊMEA BOVINA.....	5
4. PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DE CIO E OVULAÇÃO EM BOVINOS.....	8
4.1. Controlo farmacológico da emergência de uma nova onda folicular.....	9
4.1.1. Encurtar a fase lútea.....	10
4.1.2. Prolongar a fase lútea.....	11
4.2. Sincronização do estro.....	12
4.2.1. PGF _{2α}	12
4.2.2. Progesterona/Progestagénio (P4).....	12
4.2.2.1. Catorze dias de tratamento.....	12
4.2.2.2. Sete dias de tratamento.....	13
4.3. Sincronização da ovulação.....	14
4.3.1. Ovsynch.....	14
4.3.2. Modificações do Ovsynch.....	15
5. ESTUDO EXPERIMENTAL: COMPARAÇÃO DE DOIS PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DE CIO EM NOVILHAS DE RAÇA MERTOLENGA.....	17
5.1. Introdução.....	17
5.2. Caracterização do local.....	18
5.3. Caracterização do grupo.....	19
5.4. Protocolos.....	20

5.4.1. Protocolo 1 (P4 onze dias + PGF _{2α} + eCG).....	20
5.4.2. Protocolo 2 (CO-Synch + P4 sete dias).....	22
5.5. Inseminação artificial.....	23
5.6. Diagnóstico de gestação.....	23
5.7. Resultados.....	24
5.8. Discussão e Conclusões.....	28
BIBLIOGRAFIA.....	31
ANEXOS.....	33

1. A RAÇA BOVINA MERTOLENGA

As raças autóctones são conhecidas por tirarem um melhor proveito do ambiente de onde são originárias, refletindo-se essa adaptabilidade numa boa aptidão maternal, elevada rusticidade e boa adaptação tanto ao meio ambiente como ao tipo de alimento encontrado nesse meio (Pinto de Andrade, et al. 1999).

Em Portugal podemos encontrar sete raças autóctones de bovinos produtores de carne com denominação de origem protegida (DOP) sendo elas a Barrosã, a Mirandesa, a Maronesa, a Marinhosa, a Arouquesa, a Alentejana e a Mertolenga (Pinto de Andrade, et al. 1999). Nesta tese iremo-nos focar na raça bovina Mertolenga visto ter sido esta a raça usada no trabalho experimental.

A região de onde provem esta raça ainda é, atualmente, um tema profundamente controverso. Segundo Lopes Frazão (1959), citado por Mertolengos, 2018, em 1900 as primeiras Mertolengas foram criadas em terras Algarvias próximas do Guadiana sendo que, na altura, eram conhecidas como “Malhadas do Baixo Guadiana”.

Para Teófilo Frazão e Bernardo Lima, eram caracterizadas como uma raça alentejana pequena, bem vocacionada para o trabalho, sem grandes necessidades alimentares e bem adaptada aos solos áridos das regiões do Baixo Alentejo, mais precisamente Mértola, Alcoutim e Martinlongo (Frazão 1953). Devido a estas qualidades, que se sobreponham às que eram encontradas nas raças das regiões do Tejo, Sado e Sorraia (Alentejana, Mirandesa e Brava), ela foi-se irradiando tendo agora grande afluência nas regiões do Ribatejo e Alentejo (Frazão 1953, Mertolengos 2018).

Esta raça foi sofrendo diversos cruzamentos, que se refletem nas diversas características fenotípicas que estes animais apresentam entre si que é bastante notória, principalmente, no tipo de pelagem que pode variar entre a vermelha, a malhada e a rosilho mil-flores (Frazão 1953, Mertolengos 2018).

Os primeiros registos oficiais da raça ocorreram em 1979, usando como base de dados o Registo Zootécnico até ao surgimento do Livro Genealógico (LG) da Raça Mertolenga em 1993, ambos com o intuito de assegurar e manter a pureza da sua linha genética. O LG está dividido em duas áreas principais sendo elas o livro de nascimentos, onde são registados todos os nascimentos de linhas puras, e o livro de adultos, onde se encontram os animais aprovados como reprodutores segundo o regulamento do LG (Castro, et al. 2005, Mertolengos 2018).

Atualmente estão registadas 15.707 fêmeas em idade reprodutiva e 226 machos reprodutores, distribuídos por 204 criadores ao longo dos concelhos de Castelo Branco, Santarém, Setúbal, Portalegre, Évora e Beja (Mertolengos 2018).

Segundo o Regulamento do Livro Genológico do Bovino Mertolengo e segundo a Associação de Criadores de Bovinos de Raça Mertolenga (ACBM), esta raça apresenta as seguintes características fenotípicas: corpulência de tamanho mediano; 4 tipos diferentes de pelagem (Vermelha, Rosilho Mil-Flores, Vermelha Malhada e Malhada de Vermelho); mucosas claras ou ligeiramente pigmentadas; cabeça de tamanho médio e com forma alargada; pescoço curto, bem ligado e barbela pouco desenvolvida; peito relativamente destacado; garupa comprida mas não muito larga, musculada e tendencialmente horizontal; membros finos, musculados, aprumados e de boas proporções com unhas finas, rijas e sem malhas brancas junto a elas. Estes animais têm tendência a ser classificados como nervosos quanto ao seu temperamento (Mertolengos 2018). Na Figura 1 é possível ver algumas destas características fenotípicas.

Há alguns anos que a Mertolenga é considerada uma das raças autóctones com melhor adaptação a condições alimentares adversas, tanto a nível quantitativo como a nível qualitativo, características muito comumente encontradas nas zonas do Baixo Alentejo, pelo que representa um património genético de grande valia (Castro, et al. 2005).

Também são destacadas quanto às qualidades reprodutivas que possuem visto apresentarem boas qualidades maternas, elevada fertilidade, facilidade de partos e boa capacidade leiteira que resulta numa elevada produtividade de vitelos ao desmame (Bettencourt, et al. 1986). É então compreensível o uso destes animais em cruzamentos com o objetivo de melhorar as eficiências reprodutivas das explorações (Mertolengos 2018).



Figura 1 - Novilhas Mertolengas submetidas ao estudo experimental. Original (2017)

2. PUBERDADE EM NOVILHAS

A puberdade é definida como o momento em que ocorre um primeiro estro e ela difere do termo “maturidade sexual” que pode ser definida como a altura em que se dá o primeiro estro associado a uma ovulação potencialmente fértil e seguido duma fase lútea de duração normal (Atkins, et *al.* 2013, Estill 2015, Larson, et *al.* 2016). É então importante ter noção que os animais não devem ser cobertos quando atingem a puberdade visto que a eficiência reprodutiva destes, principalmente a fecundidade, não atingiu ainda o potencial máximo (Estill 2015, Noakes, et *al.*, 2009a).

É bastante usual, 7 a 10 dias antes do primeiro cio ovulatório, a ocorrência de uma ovulação sem sinais de cio, apelidada de “ovulação silenciosa”. Nestas situações, a fase lútea é relativamente curta, mas é essencial isto ocorrer para que haja exposição prévia à progesterona (P4) essencial para que, no ciclo seguinte, a secreção de Prostaglandina F 2 alfa (PGF_{2α}) pelo útero surja mais tardiamente e, assim, alongar a fase lútea (Atkins, et *al.* 2013, Estill 2015, Larson, et *al.* 2016, Noakes, et *al.* 2009a).

Em novilhas é também relativamente comum [13% a 22% para Stevenson (2007); 17% a 63% para Atkins et *al.* (2013)] existir um primeiro estro anovulatório, 3 meses antes do surgimento dum primeiro ciclo éstrico normal, sendo que o mecanismo pelo qual isto acontece ainda não é conhecido, mas é sabido que é afetado pela raça, idade, época reprodutiva e fotoperíodo (Atkins, et *al.* 2013, Larson, et *al.* 2016, Stevenson 2007).

Tem sido referido que, em média, a puberdade em novilhas ocorre entre os 9 e os 10 meses de idade, mas existem relatos que comprovam que uma fêmea pode atingir a puberdade num espaço de tempo que varia entre os 6 e os 24 meses de idade. Assim sendo, é de extrema importância ter noção que a idade à puberdade é influenciada por diversos fatores tais como a condição corporal, peso (50% do peso adulto em novilhas de aptidão leiteira e 60% em novilhas de aptidão de carne), raça, alimentação, genética e sazonalidade, pelo que o manejo das novilhas deve ser o mais adequado possível (Atkins, et *al.*, 2013, Estill 2015).

É possível controlar com maior precisão o momento em que uma novilha atinge a puberdade através de medições semanais da concentração de P4 plasmática. Quando esses valores excederem 1ng/mL pode afirmar-se que o animal entrou em puberdade e isto ocorre, em média, por volta dos 10 a 11 meses de idade (Estill 2015).

O primeiro estro ovulatório associado a uma fase lútea de duração normal, ou seja, a maturidade sexual, está dependente de diversas alterações que vão surgindo em cascata no

sistema nervoso central, no hipotálamo, na pituitária e nos ovários (Stevenson 2007). Nas novilhas, isto tem início quando o eixo hipotálamo-hipofiso-gonadal começa a perder a sensibilidade aos efeitos de “feedback” negativos do estradiol, surgindo assim um pico da hormona gonadoliberina (GnRH). Esta última promove a secreção de gonadotropinas (hormona folículo estimulante – FSH e hormona luteinizante – LH) essenciais para que ocorra maturação folicular (Atkins, et al. 2013, Estill 2015).

Por volta da segunda semana de vida pós-natal começam a desenvolver-se folículos num padrão regular e repetitivo, padrão esse a que se denomina de “ondas foliculares”, similarmente ao que acontece em vacas adultas cíclicas. Tudo isto se inicia com uma fase de recrutamento folicular, originado por aumentos transitórios da FSH, seguindo-se, 36 a 48 horas depois, da fase de seleção folicular (Noakes, et al. 2009a). Os folículos inicialmente recrutados secretam estradiol e inibina, hormonas que inibem a secreção de FSH e o folículo que é selecionado tem a capacidade de sobreviver em ambientes pobres em FSH enquanto que os restantes folículos, os subordinados, acabam por sofrer atresia. Este folículo continua a crescer até atingir um diâmetro máximo (10mm a 20mm), porém ele não tem capacidade para ovular devido à inatividade hipotalâmica existente e consequente falta de secreção de pulsos de GnRH essenciais para que ocorra libertação necessária de LH (a frequência de pulsos da LH é de 1 a 4 em 24 horas nestes animais, enquanto que, em animais cíclicos, ela é de aproximadamente 1 pulso por hora) (Atkins, et al. 2013, Stevenson 2007).

Aquando a fase de transição, 2 a 4 semanas prévias ao surgimento da primeira ovulação, a frequência de pulsos da LH aumenta gradualmente concomitantemente com um aumento na concentração da P4 plasmática. Nesta fase, as concentrações de recetores de estradiol no hipotálamo começam a diminuir com o aumento simultâneo da frequência pulsátil da GnRH (Stevenson 2007). Esta vai então promover a secreção de FSH, responsável pelo crescimento folicular e secreção de estradiol pelos folículos formados, e a secreção de LH, responsável pela maturação, luteinização e ovulação do folículo dominante. Presentemente, o estradiol, ao atingir concentrações suficientemente elevadas, induz um pico de GnRH com consequente pico pré-ovulatório de LH ocorrendo, por fim, a ovulação e a formação de um corpo lúteo (CL) funcional, responsável pela secreção de P4 (Ptaszynska 2009, Stevenson 2007).

Nessa altura é bastante comum as novilhas exibirem dois picos periféricos de P4 com uma magnitude inferior à que ocorre em vacas cíclicas e com uma duração de 2 a 5 dias. Isto surge previamente aos picos de LH que, agora, já resultam numa ovulação final, visto que o hipotálamo já não apresenta recetores de “feedback” negativo para o estradiol. Contudo, esta primeira ovulação raramente é acompanhada de uma fase lútea de duração normal. Este encurtamento pensa-se que seja devido à grande concentração de recetores de ocitocina no

útero que promove a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelas células do endométrio. Esta hormona causa a lise do CL e, assim, termina a precocemente a fase lútea. Estes recetores de ocitocina, mais tarde, são inibidos através da exposição prévia à P4, de 12 a 14 dias de duração, libertada inicialmente pelo folículo luteinizado e, de seguida, pelo CL funcional (Estill 2015, Stevenson 2007).

3. O CICLO ÉSTRICO DA FÊMEA BOVINA

O ciclo éstrico da fêmea bovina é o período que decorre entre um estro (fase em que a fêmea está sexualmente recetiva e que se deixa montar) e o estro seguinte sendo que, em média, tem uma duração de 21 dias, mas pode variar entre 17 a 24 dias, todavia nas novilhas, a sua duração costuma ser menor em um ou dois dias quando se compara com o ciclo de vacas (Parish, et *al.* 2010, Stevenson 2007). A fêmea bovina é uma poliéstrica contínua, ou seja, tem ciclos éstricos que se sucedem continuamente num intervalo de tempo aproximado de 21 dias sempre que ela não esteja em condições de anestro (gestação e puerpério, pré-púbere ou patologias) (Ball & Peters 2004a).

Em cada ciclo éstrico, os folículos desenvolvem-se com um padrão de onda, designado por “ondas foliculares”, que é controlado por alterações que vão surgindo nos níveis de concentrações hormonais. Após a ovulação de um folículo, há formação de um CL que inibe a ovulação de outros folículos, por via de produção de P4 (Adams & Singh 2015, Atkins, et *al.* 2013, Perry 2004).

O ciclo éstrico pode-se dividir em duas fases distintas, segundo a função ovárica: a fase folicular (do dia 19 até ao dia do estro) e a fase lútea (do dia 1 até ao dia 18); ou em 4 estágios – estro (dia 0), metaestro (do dia 1 até ao dia 5), diestro (do dia 6 até ao dia 17) e pró-estro (do dia 18 até ao dia do estro) (Stevenson 2007).

Assim sendo, o dia 0 é atribuído ao dia em que a fêmea entra em estro, que é causado pelo incremento de estradiol 17β (E2) que apenas pode ocorrer após a regressão do CL e consequente diminuição da P4, com aumento simultâneo do folículo pré-ovulatório (Stevenson 2007). O E2 atinge um nível máximo em circulação cerca de 12 a 18 horas antes do estro, e é responsável pelos sinais de cio e coincidente com o início do pico pré-ovulatório da LH, visto que a alta concentração de E2 circulante desencadeia o pico pré-ovulatório da GnRH e a consequente secreção das hormonas gonadotrópicas (FSH e LH) (Amstalden & Williams 2015).

O folículo dominante, que se prepara para ovular, vai sofrer maturação que está dependente de interações com a FSH e LH através de recetores presentes nas células da

granulosa e nas células da teca. A ligação da LH aos recetores presentes nas células da teca estimula a produção de androgénios, enquanto que a ligação da FSH aos recetores das células da granulosa provoca a conversão destes androgénios em E2 permitindo que as concentrações desta hormona vão aumentando progressivamente. Quando o E2 atinge o seu limiar máximo, as concentrações de LH aumentam sendo que a sua frequência pulsátil passa de 4 a 6 pulsos a cada hora (padrão característico da fase folicular) para um pulso por hora (com diminuição da amplitude do pulso) e começam-se a detetar os sinais de cio (Amstalden & Williams 2015, Atkins, et al. 2013, Ball & Peters 2004a, Stevenson 2007).

A ovulação ocorre quando há rutura do folículo dominante e consequente libertação do óócito, iniciando-se aqui a segunda fase do ciclo éstrico (Parish, et al. 2010). O metaestro caracteriza-se pelo final da maturação folicular e ovulação do folículo dominante que é induzida cerca de 30 horas após o início do estro e é precedida dum rápido declínio dos níveis plasmáticos de E2 (Adams & Singh, 2015). Após a ovulação, as células foliculares tornam-se células lúteas para formarem o CL (luteinização). Esta estrutura tem como objetivo principal a produção de P4 para preparar o útero para a gestação, manter a gestação e, também, inibir o estro e ovulação. Ou seja, à medida que o CL cresce, a produção de P4 também aumenta e podem detetar-se concentrações plasmáticas de P4 elevadas a partir do quinto dia do ciclo éstrico (Ball & Peters 2004a, Perry 2004).

Quando se começam a detetar aumentos na concentração da P4 circulante pode afirmar-se que a fêmea entrou em diestro (ou na fase lútea) e esta fase prolonga-se até ao momento em que ocorre regressão do CL. Aqui regista-se um segundo aumento de FSH, com magnitude inferior àquela que ocorre momentos antes da ovulação. O aumento dos níveis desta hormona é crítico para o recrutamento da primeira onda de folículos antrais (Stevenson 2007). Após este recrutamento há um folículo (folículo dominante) que é selecionado para continuar a crescer. Ao tornar-se o folículo dominante, vai ter a capacidade de inibir o crescimento dos outros folículos (Ball & Peters 2004a).

Caso a P4 não esteja presente, o folículo dominante vai sofrer ovulação após o estro, mas, se houver P4 em circulação, ele vai sofrer atresia e uma nova onda folicular irá ter início (Perry 2004). Assim sendo, aquando a formação e maturação do CL, os níveis plasmáticos da P4 vão aumentando gradualmente até atingir o pico aproximadamente aos 8 dias após a ovulação. Nesta fase, as concentrações de LH estão relativamente baixas e as concentrações de FSH e de E2 vão flutuando em sintonia com as ondas foliculares (Adams & Singh 2015, Ball & Peters 2004a).

A fase lútea inicia-se quando o CL secreta concentrações significativas de P4 excedendo, normalmente, o 1ng/mL por volta do 4º/5º dia do ciclo. A partir deste momento, a P4 vai então

ser a responsável pelo “feedback” negativo da LH, sendo que a secreção desta volta a diminuir para frequências de 4 a 6 pulsos por hora, mas com amplitudes maiores. A P4 atinge concentrações máximas entre o dia 8 e o dia 10 do ciclo éstrico, dias que coincidem com o tamanho máximo do CL (Adams & Singh 2015, Stevenson 2007).

Aproximadamente no dia 17 do ciclo, caso não ocorra uma fertilização, haverá libertação de PGF_{2α} pelas células do endométrio que vai causar a lise do CL em 3 a 5 dias e, conseqüentemente, vai haver uma diminuição da concentração plasmática da P4. Voltam a surgir as secreções de GnRH e LH, reiniciando-se, desta forma, a fase folicular e o princípio de mais uma nova onda folicular (Adams & Singh 2015, Ball & Peters 2004a, Stevenson 2007).

Caso o animal fique gestante, o embrião previne a libertação de PGF_{2α} pelo útero e continua a haver secreção de P4 por parte do CL (Parish, et al. 2010). O reconhecimento materno da gestação ocorre por volta do dia 15 do ciclo éstrico, quando o embrião envia sinais luteotróficos (libertação do Interferão-Tau) (Ball & Peters 2004a, Perry 2004).

O padrão de secreção de GnRH, e subsequentemente da FSH e da LH, que ocorre durante a fase folicular é essencial para que haja desenvolvimento e maturação do folículo dominante, e este padrão ocorre com o aumento de E2 em circulação que é manifestado no final desta fase. Quando a FSH é libertada, ela estimula o crescimento de grupos de folículos (“recrutamento folicular”). Estes folículos produzem E2 e inibina à medida que vão crescendo e, estas hormonas, suprimem a secreção de FSH. Apenas um dos folículos consegue sobreviver em ambientes com baixos níveis de FSH sendo que é este que será selecionado para continuar a crescer enquanto que os restantes sofrerão atresia (Adams & Singh, 2015).

No momento em que o folículo dominante atinge o seu diâmetro máximo (10 a 20mm), devido às baixas concentrações de P4 e às altas concentrações de E2 que induzem o pico de GnRH e conseqüente pico de LH, acaba por ser luteinizado e ovula (Atkins, et al. 2013, Parish, et al. 2010). Nos momentos do ciclo éstrico em que a P4 está presente, ou seja, na presença de um CL, as concentrações de E2 circulantes aumentam e diminuem à medida que as ondas crescem e regridem. Na ausência de P4, o E2 atinge elevadas concentrações responsáveis pelo pico pré-ovulatório da LH. Normalmente são necessárias duas a três ondas foliculares para que haja regressão do CL e, assim, ocorra ovulação (Parish, et al. 2010, Perry 2004).

Nas situações em que as fêmeas apresentam ondas foliculares, mas sem ocorrer ovulação, diz-se que estas estarão em “anestro” ou “acíclicas” e este acontecimento, quando fisiológico, ocorre antes da puberdade, em vitelas/novilhas, ou em gestantes e no puerpério, em vacas, sendo que se consegue minimizar os períodos de anestro (excetuando o do período de

gestação) se se proceder a um bom manejo dos animais e estes estiverem a ser bem alimentados (Parish, et al., 2010, Perry 2004).

Na Figura 2 é demonstrado um esquema do ciclo éstrico e derivadas alterações fisiológicas, segundo Lippincott et al., 1998.

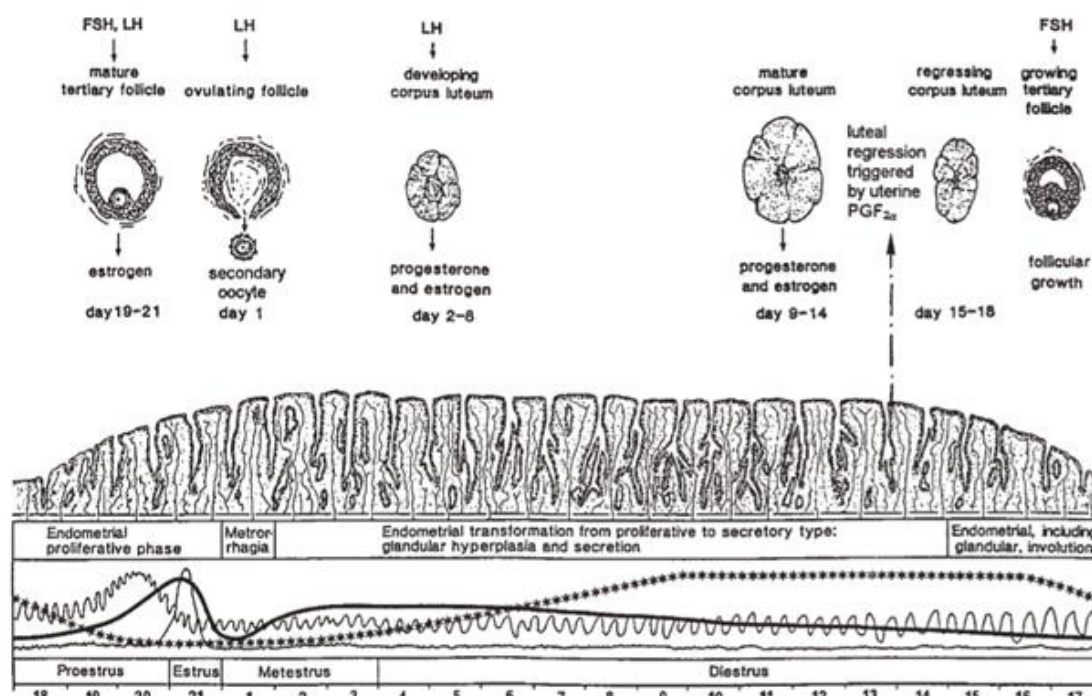


Figura 2 – Alterações ovárias, uterinas e hormonais do ciclo éstrico da fêmea bovina. Lippincott Williams & Wilkins (1998)

4. PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DE CIO E OVULAÇÃO EM BOVINOS

As eficiências reprodutivas dum efetivo, quer seja leiteiro ou de carne, são as que afetam mais a produção e, assim, a eficiência da exploração. Nos locais em que se recorre ao uso da inseminação artificial (IA) há que considerar que a deteção de cios é a atividade mais importante na concretização de uma boa taxa de fertilidade e de um intervalo entre partos reduzido. Todavia, uma das grandes desvantagens desta tarefa (deteção de cios) é o tempo requerido para a concretizar e, em bovinos de corte, torna-se particularmente difícil visto que a maioria destes regimes recorre às práticas do sistema extensivo. Assim, começaram a ser desenhados protocolos de sincronização de cios com o objetivo de obter maiores taxas de gestação à primeira IA (ou cobrição), com menores intervalos entre partos, sem necessidade de recorrer à deteção

de cio ou, nos protocolos em que tal continua a ser necessário, estes permitem realizar esta tarefa num menor espaço de tempo e de forma agrupada (Ball & Peters 2004b, Kasimanickam 2015, Ptaszynska 2009).

A IA é uma técnica de reprodução assistida, comercialmente disponível a partir dos meados do Séc. XX, que consiste na deposição de sémen (fresco, refrigerado ou descongelado) no corpo uterino da fêmea (Lamb, et *al.* 2013). Foi usada primariamente apenas com objetivos sanitários, em que a ideia seria a de diminuir a transmissão de doenças venéreas através do touro de cobertura. Porém, quando o uso de sémen congelado se tornou exequível, as vantagens foram aumentando, sendo o melhoramento da fertilidade e da genética duas das mais importantes. Ela abriu portas aos esquemas de melhoramento de reprodução, tais como a introdução de programas de sincronização de cios, útil para realizar a IA no momento mais pertinente, e a outras técnicas de reprodução assistida como o uso de sémen sexado, a transferência de embriões, a produção de embriões *in vitro*, a clonagem e transgênese (Farin, et *al.* 2007, Kasimanickam 2015, Lamb, et *al.* 2013,).

O uso de protocolos de sincronização de cios/ovulações associados à IA tornou-se frutuoso devido à frequência alta e previsível de cios com respostas ovulatórias num período de tempo restrito obtendo-se, como resultado final, uma alta taxa de gestação à primeira IA com subsequente agrupamento de partos. Outra grande vantagem destes programas é o de ser possível antecipar e agrupar as épocas de partos e assim melhorar o manejo do efetivo para as próximas épocas reprodutivas. Os protocolos são aplicados de forma a controlar a emergência de uma nova onda folicular, prolongar ou diminuir as fases lúteas, induzir o cio e/ou sincronizar a ovulação (Kasimanickam 2015, Lamb, et *al.* 2013, Ptaszynska 2009).

4.1. CONTROLO FARMACOLÓGICO DA EMERGÊNCIA DE UMA NOVA ONDA FOLICULAR

Nestes métodos pode recorrer-se ao uso de progestagénios com o objetivo de suprimir a FSH e a LH através do feedback negativo que eles exercem sobre a libertação das gonadotropinas. Esta aplicação tem por base o conhecimento existente sobre a emergência das ondas foliculares serem, numa primeira fase, dependentes de FSH e, mais tardiamente, o folículo dominante ser dependente de LH (Kasimanickam 2015). Porém, o uso destas hormonas exógenas não bloqueia por completo a libertação das gonadotropinas pelo que, se estiver presente um folículo dominante no ovário, este irá persistir até ao momento da remoção do progestagénio. Estes folículos dominantes persistentes causam uma diminuição da fertilidade,

pois os oócitos que por eles serão libertados estarão envelhecidos, podendo então ocorrer perdas embrionárias (Day & Allen Brides 2013, Ptaszynska 2009).

Para prevenir estas situações, recorre-se então ao uso da GnRH no início destes tratamentos. Visto que esta é a hormona responsável pela libertação da FSH e da LH, caso haja um folículo dominante aquando da sua utilização, promoverá a luteinização e ovulação, garantindo assim, que o progestagénio irá ter atuação na nova onda folicular que surgirá 1 a 2 dias depois (Kasimanickam 2015, Ptaszynska 2009).

Estes protocolos têm a vantagem de induzir ciclicidade em fêmeas que se apresentem em anestro, pois os progestagénios, ao sensibilizarem o eixo hipotálamo-hipofiso-gonadal, garantem um CL de duração normal ao mesmo tempo que aumentam a frequência de libertação pulsátil da LH promovendo assim o melhor desenvolvimento do folículo dominante. Por vezes, também se pode recorrer ao uso da gonadotropina coriónica equina (eCG), cujo efeito é semelhante ao da FSH, no dia da remoção do progestagénio e assim estimular o recrutamento e maturação foliculares com consequente ovulação (Johnson, et al. 2013, Lamb, et al. 2013, Ptaszynska 2009).

Este é também o método ideal para efetivos de aptidão cárnica, pois permite o agrupamento de cobrições com altas taxas de gestação ao primeiro cio sincronizado (Lamb, et al. 2013, Ptaszynska 2009).

4.1.1. ENCURTAR A FASE LÚTEA

Fisiologicamente, o processo que dá origem à luteólise inicia-se através da ação do E2 presente no folículo pré-ovulatório. Este induz a libertação de ocitocina pela neuro-hipófise que, por sua vez, suscita a libertação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelas células do endométrio sendo esta a hormona responsável pela regressão do CL (Ball & Peters 2004b, Kasimanickam 2015, Noakes, et al. 2009b).

Deste modo, ao administrar-se uma $\text{PGF}_{2\alpha}$ exógena a partir do 5º dia do ciclo éstrico (presença dum CL sensível) é possível induzir a luteólise precocemente. Com isto, a P4 diminui até níveis basais num espaço de 24 horas, concomitantemente com um aumento da frequência pulsátil da LH, necessária para que ocorra ovulação. Porém, o intervalo de tempo entre a administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$ e a ovulação varia consoante o estágio da onda folicular em que se procede ao tratamento. Se as fêmeas tiverem um folículo dominante aquando da sua aplicação, elas entrarão em cio em 2 a 3 dias, enquanto que se o folículo ainda estiver na fase da pré-

dominância ou estiver a regredir serão necessários 4 a 6 dias para que haja formação do folículo dominante e, só depois, é que ocorrerá a ovulação (Kasimanickam 2015, Ptaszynska 2009).

Com estes tratamentos podem-se atingir taxas de fertilidade muito semelhantes às que ocorrem com a cobrição natural. Em vacas de aptidão leiteira estes protocolos, associados à IA, têm resultado em altas taxas de concepção em múltiplos programas decritos. Em efetivos de carne, o uso deste programa já não é tão aconselhado devido à alta incidência de anestro pós-parto que apresentam e, conseqüentemente, à obrigatoriedade de ser usado em fêmeas que estejam cíclicas visto atuar-se diretamente sobre um CL funcional (Lamb, et *al.* 2013, Ptaszynska 2009).

4.1.2. PROLONGAR A FASE LÚTEA

O uso de progestagénios, por meio de dispositivos intravaginais, tem 3 objetivos principais, sendo eles: manter os níveis de P4 suficientemente elevados (>1ng/mL) para que haja supressão do pico de LH; induzir a ciclicidade em animais em anestro, visto que inicialmente a P4 induz a diminuição da secreção da LH mas, de seguida, causa um aumento da sua frequência pulsátil, promovendo assim, o desenvolvimento de folículos dominantes para que, após a remoção do progestagénio, ocorra ovulação com uma fase lútea normal; e, resolver situações de doença quística ovárica, pois a P4 diminui a secreção de LH que se apresenta anormalmente elevada causando o “turnover” do folículo quístico e permitindo que se desenvolva um novo e saudável folículo dominante (Johnson, et *al.* 2013, Kasimanickam 2015).

Em média, 85% dos animais sujeitos a este tratamento revelam cio, 36 a 72 horas após a remoção do dispositivo intravaginal. Caso se recorra ao uso da GnRH no último dia do tratamento para induzir a ovulação sincronizada, o animal poderá ser sujeito à inseminação artificial a tempo fixo (IATF) 48 a 84 horas após a sua administração. Se não se optar pelo uso desta hormona, é necessário que seja efetuada uma eficiente deteção de cio e a IA realizada 12 horas após observação dos sinais de cio (Johnson, et *al.* 2013, Kasimanickam 2015).

Os tratamentos que duram 14 a 21 dias resultam em percentagens de fêmeas em cio bastante elevadas num espaço de 3 dias após a remoção do dispositivo, mas, como foi referido anteriormente, estes programas apresentam baixas taxas de fertilidade devido ao envelhecimento dos oócitos presentes no folículo dominante persistente. Assim sendo, os protocolos mais comumente usados são os que mantêm o dispositivo durante 7 a 9 dias (Day & Allen Brides 2013, Kasimanickam 2015).

4.2. SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO

4.2.1. PGF_{2α}

Como já referido anteriormente, esta hormona tem como objetivo causar a lise do CL. Podem ser usadas hormonas naturais ou análogos sintéticos (por ex., o cloprostenol). Está descrito que mais de metade dum efetivo cíclico (55 a 65%) entra em cio após a sua aplicação, mas é possível melhorar esta taxa se for aplicada uma segunda dose passados 11 a 14 dias para garantir que todas as vacas sujeitas ao tratamento tenham, na última administração, um CL sensível ao fármaco administrado (Kasimanickam 2015). Porém estas taxas nunca atingem os 100% pois, pelo menos nas vacas leiteiras, nem todos os CL funcionais respondem à ação da PGF_{2α} (Johnson, et al. 2013).

Ao longo dos anos foram desenvolvidos muitos protocolos à base desta hormona sendo que não existe um que seja o ideal para todos os efetivos. A escolha do mais adequado depende de diversos fatores sendo eles a qualidade de deteção de cios, a mão de obra existente, os objetivos do programa a desenvolver e o custo dos tratamentos (Kasimanickam 2015).

4.2.2. PROGESTERONA/PROGESTAGÉNIO (P4)

4.2.2.1. CATORZE DIAS DE TRATAMENTO

Para combater o problema da baixa fertilidade revelada pelos programas longos de progestagénios, é usual associar-se a aplicação da PGF_{2α} 19 dias após a remoção do dispositivo intravaginal. Assim sendo, ela irá atuar sobre o CL resultante da ovulação do folículo persistente de forma a induzir uma nova onda folicular. É necessário realizar a deteção de cio 2 a 4 dias após a aplicação da PGF_{2α} e proceder à IA 12 horas após a sua observação (sistema a.m.-p.m.) (Kasimanickam 2015).

Recorre-se com frequência a este tipo de programas nas novilhas de substituição devido à vantagem que a P4 tem em induzir a ovulação nos animais pré-púberes (pré-sincronização do estro) (Johnson, et al. 2013, Kasimanickam 2015, Lamb, et al. 2013).

Na Figura 3 esquematiza-se o protocolo de sincronização descrito.

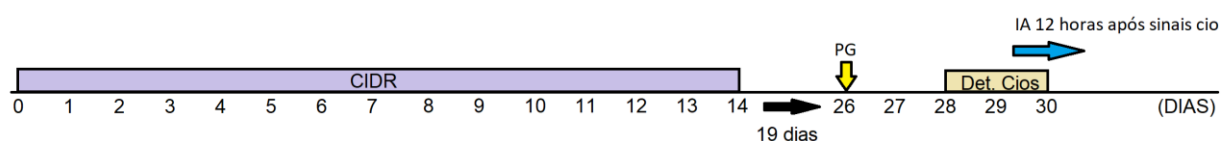


Figura 3 – CIDR® (Zoetis) 14 dias + PGF_{2α}.

PG = PGF_{2α}; Det. Cios = Detecção de cios; IA = Inseminação Artificial

4.2.2.2. SETE DIAS DE TRATAMENTO

Com este protocolo é garantido que no dia da remoção da P4, todos os animais cíclicos terão, no mínimo, um CL de 7 dias de idade. Consequentemente é usual administrar-se a PGF_{2α} no dia da remoção do dispositivo (ou 24 horas antes) para que ocorra a luteólise. O cio será detetado entre 2 a 6 dias após a remoção da P4 e pode-se realizar a IA através do sistema a.m.-p.m. (Johnson, et *al.* 2013, Kasimanickam 2015).

Também é vantajoso usar-se a GnRH no primeiro dia do tratamento por forma a garantir que haja a luteinização de qualquer folículo maduro que possa estar presente (Johnson, et *al.* 2013, Kasimanickam 2015). Segundo Lamb et *al.* (2013), este método aumenta as taxas de concepção até 10% (Lamb, et *al.* 2013).

Na Figura 4 esquematiza-se o protocolo de sincronização descrito.

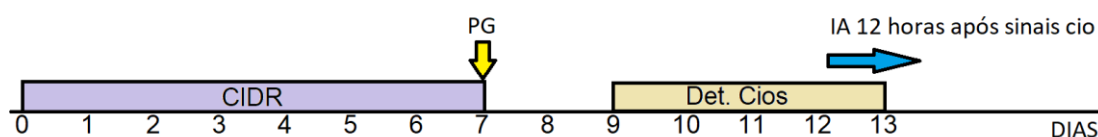


Figura 4 - CIDR® (Zoetis) 7 dias + PGF_{2α}

PG = PGF_{2α}; Det. Cios = Detecção de cios; IA = Inseminação Artificial

4.3. SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO

Estes programas têm como base o uso conjugado de GnRH e PGF_{2α}, com ou sem suplementação de P4 e são úteis para os casos em que é desejado realizar-se IATF, cuja altura da IA é previamente definida (Bridges, et al. 2007, Kasimanickam 2015).

4.3.1. OVSYNCH

Este protocolo é indicado principalmente para vacas de aptidão leiteira e envolve duas administrações dum análogo de GnRH intercaladas por uma administração única de PGF_{2α}. Com isto consegue-se uma grande homogeneidade dos estádios foliculares no momento em que se induz a luteólise, permitindo assim uma boa previsão da altura da ovulação (Ptaszynska 2009).

A primeira administração de GnRH tem como objetivo induzir a ovulação ou luteinização do folículo por forma a criar uma nova onda folicular aproximadamente 3 dias depois. A PGF_{2α} é administrada passados 7 dias após administração da GnRH para causar a regressão do CL que se formou ou do folículo que se luteinizou. Quarenta e oito horas depois é aplicada a segunda dose de GnRH para aumentar a sincronia de ovulação do efetivo visto que ela ocorrerá 26 a 32 horas depois, podendo assim realizar-se a IATF passadas 8 a 24 horas da última administração hormonal (Bridges, et al. 2007, Johnson, et al. 2013, Kasimanickam 2015, Ptaszynska 2009).

Nos protocolos CO-Synch realiza-se a segunda administração da GnRH na mesma altura em que se procede à IATF (48 horas após a administração da PGF_{2α}). Isto apresenta a vantagem de ter de manusear menos vezes os animais. Contudo existem estudos que referem que um intervalo de 60 a 64 horas após a PGF_{2α} seria mais indicado para a aplicação de GnRH (Bridges, et al. 2007, DeJarnette 2001, Johnson, et al. 2013, Kasimanickam 2015, Ptaszynska 2009).

Estes tratamentos apresentam maiores taxas de fertilidade em animais que ovulam aquando da primeira administração de GnRH e as vacas adultas também apresentam melhores resultados quando comparadas com as novilhas, pois a sincronia folicular à primeira administração é melhor nas fêmeas adultas (Kasimanickam 2015, Ptaszynska 2009).

Com estes programas, o uso dum dispositivo intravaginal de P4 desde o primeiro dia até ao sétimo dia torna-se vantajoso para impedir que ocorram ovulações antes do fim do tratamento e, assim, melhorar as taxas de fertilidade dos efetivos (Bridges, et al. 2007, Johnson, et al. 2013, Kasimanickam 2015).

Nas Figuras 5 e 6 estão esquematizados os protocolos de sincronização descritos.

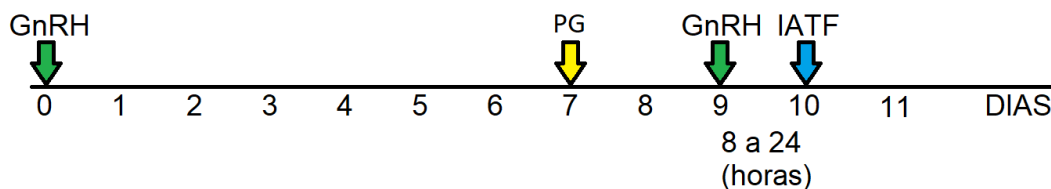


Figura 5 – Ovsynch

PG = PGF_{2α}; IATF = Inseminação Artificial a Tempo Fixo

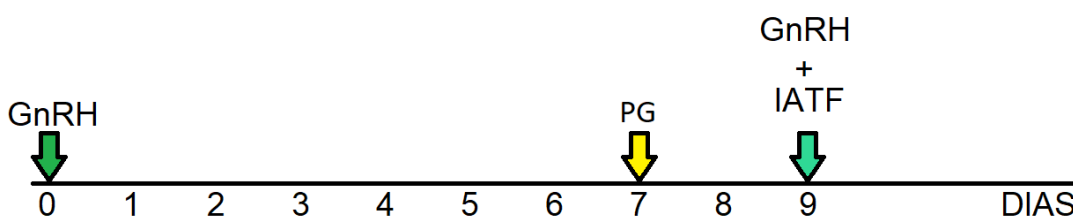


Figura 6 - CO-Synch

PG = PGF_{2α}; IATF = Inseminação Artificial a Tempo Fixo

4.3.2. MODIFICAÇÕES DO OVSYNCH

Devido à grande dependência do tamanho dos folículos para ocorrência da resposta ovulatória após a administração da GnRH, foram desenvolvidas modificações aos protocolos do Ovsynch com o objetivo de aumentar a probabilidade de ocorrência de ovulação após a primeira administração daquela hormona (Kasimanickam 2015, Ptaszynska 2009).

Uma das modificações realizadas é a aplicação dupla de PGF_{2α} com um intervalo de 14 dias e iniciar-se o protocolo de Ovsynch normal passados 12 dias. Este método aumentou as taxas de concepção em 18% em vacas lactantes cíclicas (Johnson, et al. 2013, Kasimanickam 2015, Ptaszynska 2009). Na figura 7 esquematiza-se o protocolo de sincronização descrito.

Outro método possível é um protocolo denominado de G6G e que consiste na administração inicial de PGF_{2α}, para induzir a luteólise dum CL que possa estar presente, seguida da administração de GnRH passados 2 dias, de maneira a promover a ovulação. Com esta

conjugação pretende-se garantir o início de uma nova onda folicular e, passados 6 dias, inicia-se o protocolo Ovsynch normal (Johnson, et al. 2013, Kasimanickam 2015, Ptaszynska 2009), conforme se esquematiza na Figura 8.

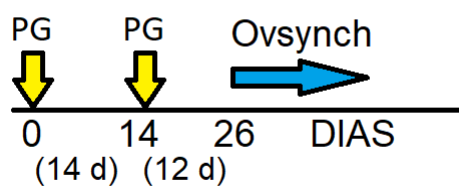


Figura 7 - Ovsynch dupla $\text{PGF}_{2\alpha}$

PG = $\text{PGF}_{2\alpha}$

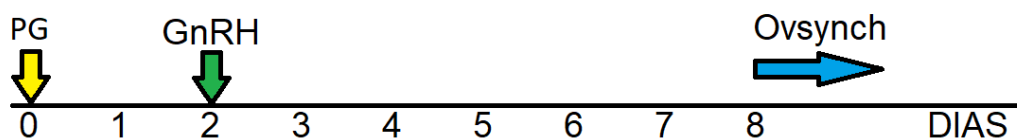


Figura 8 - Ovsynch G6G

PG = $\text{PGF}_{2\alpha}$

5. ESTUDO EXPERIMENTAL – COMPARAÇÃO DE DOIS PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DE CIO EM NOVILHAS DE RAÇA MERTOLENGA

5.1. INTRODUÇÃO

O protocolo Ovsynch foi desenvolvido por Pursley *et al.* (1995) tendo como objetivo facilitar o manejo reprodutivo na exploração, diminuindo o tempo despendido na deteção de cios, visto ter sido desenhado para que a IA seja realizada num tempo previamente determinado (IATF). Este método tem a vantagem adicional de agrupar as alturas de partos e assim conseguir obter lotes de vitelos mais homogêneos, em explorações de bovinos de carne (Pursley, *et al.* 1995).

Contudo, este protocolo pode resultar em baixas taxas de gestação, visto que o seu sucesso depende da fase do ciclo em que o animal se apresenta aquando do início da sua aplicação e, também, apenas resulta em vacas cíclicas. Com isto foram surgindo modificações ao protocolo Ovsynch com o intuito de serem aplicáveis em animais cíclicos ou acíclicos e independentemente da fase do ciclo em que estes estejam, para se tentar melhorar as taxas de gestação (Azevedo, *et al.* 2014).

Neste trabalho foram comparados 2 protocolos de sincronização de cios em novilhas de raça Mertolenga. Um deles, o CO-Synch, é uma modificação do Ovsynch clássico com suplementação de P4, através dum CIDR® (Zoetis, Portugal), durante 7 dias e IATF conjuntamente com a administração dum análogo da GnRH, 54 a 56 horas após a administração da PGF_{2α}. Neste caso optou-se por se realizar uma 2ª IA, 12 horas depois da primeira. O segundo protocolo baseia-se na aplicação dum CIDR® (Zoetis), durante 11 dias, com administração de PGF_{2α}, 24 horas antes da sua remoção e aplicação de eCG no dia da remoção do dispositivo. Neste caso as vacas foram sujeitas à deteção de cio e foram inseminadas 12 horas após a observação dos primeiros sinais de cio.

O teste do χ^2 foi aplicado para testar diferenças entre parâmetros qualitativos das proporções que são demonstradas nos Gráficos 2, 3, 5, 6 e 7. O teste T Student foi realizado para testar as diferenças entre as médias de pesos, idade e condição corporal (CC) (parâmetros quantitativos). Todos os gráficos apresentados e testes realizados ao longo do estudo foram analisados e processados através do programa IBM® SPSS Statistics 24.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL

O presente trabalho foi realizado no Centro de Experimental do Baixo Alentejo, na Herdade da Abóbada, entre o dia 27/10/2017 e dia 29/12/2017. Os animais que entraram neste projeto encontravam-se no Monte das Valadas, sendo a manada constituída por 274 animais de raça Mertolenga registados no LG: 272 fêmeas e 2 machos. A idade média destes animais era de 9,2 anos nas fêmeas e 6,8 anos nos machos.

Os animais permanecem em regime extensivo tendo acesso à pastagem durante o ano inteiro, pastagens essas que variam entre semeadas, temporárias e permanentes, de sequeiro e de regadio, consoante a época do ano. Os animais são suplementados com feno/palha, concentrado ou grão. Têm acesso livre à água em charcos e barragens e, nos locais em que tal não ocorre, em bebedouros dispostos ao longo das pastagens.

Nestes efetivos, os adultos são sujeitos à prova intradérmica da tuberculose (tuberculinização) e ao despiste de brucelose todos os anos, entre os meses de Maio e Junho. Por esta altura, caso seja necessário, são também sujeitos à vacinação contra diversas estirpes de Clostrídios, BRSV e Parainfluenza. Desde 2012, entraram no programa Bovicare (vacinação contra BVD e IBR) que consiste na colheita anual de amostras sanguíneas para serologia de despiste de animais positivos, vacinação e refugo de fêmeas infetadas e de animais persistentemente infetados (BVD).

A nível reprodutivo, desde o ano 2000, tem sido aplicado um regime de reprodução descontínuo do efetivo de raça Mertolenga, por forma a concentrar os partos e homogeneizar os grupos de vitelos e, também, para concentrar o trabalho dos tratadores. Este regime passa pela colocação de um touro no grupo das vacas durante 6 meses, de Novembro a Maio. O touro é sujeito a um exame andrológico cerca de 52 dias antes da sua entrada na vacada. Desta forma consegue-se agrupar a altura dos partos entre os meses de Agosto e Fevereiro, época favorável à disponibilidade de recursos alimentares. Neste sistema, são consideradas vacas problemas as que, ao fim de uma época reprodutiva, não ficarem gestantes e/ou não parirem.

Nos últimos 5 anos registaram-se 944 partos (puros e cruzados), com uma maior concentração de partos em Agosto e Setembro. A idade média ao 1º parto neste intervalo de tempo foi de 36,7 meses e o intervalo médio entre partos é de 482 dias. A taxa de fertilidade anual $[(n^{\circ} \text{ de vacas que pariram um vitelo} \div n^{\circ} \text{ de vacas à cobertura num ano}) \times 100]$ é de 76%.

5.3. CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO

Das 30 novilhas nulíparas inicialmente incluídas no estudo, uma foi retirada por ter perdido o dispositivo intravaginal, acabando por se trabalhar com 29 novilhas de raça Mertolenga. As médias de peso, idade e condição corporal (CC) dos animais são descritos na Tabela 1. Os dados referentes a cada novilha estão ilustrados no Anexo 3, no fim da tese.

	Média	Mínimo	Máximo	Total
Peso (kg)	263,07	224,00	298,00	29
Idade (meses)	25,48	24,00	27,00	29
CC (0 a 5)	2,53	2,00	3,00	29

Tabela 1 - Médias de peso, idade e CC

CC = condição corporal

Dividiu-se a manada experimental num Grupo 1, de 15 animais, sujeito ao protocolo 1 (P1) e o Grupo 2, de 14 animais, sincronizadas com o protocolo 2 (P2). Os dados médios de idade, peso e CC dos dois Grupos são descritos na Tabela 2. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) de peso entre os dois grupos.

Protocolo		Peso (kg)	Idade (meses)	CC (0 a 5)
P1	Média	255,53*	25,40*	2,33*
	Mínimo	224,00	24,00	2,00
	Máximo	282,00	26,00	3,00
P2	Média	271,14*	25,57*	2,75*
	Mínimo	238,00	24,00	2,00
	Máximo	298,00	27,00	3,00

Tabela 2 - Médias de peso, idade e CC de cada Grupo

CC = condição corporal; P1 = Protocolo 1; P2 = Protocolo 2

* $p>0,05$

Antes de iniciar os protocolos de sincronização, realizou-se um exame ginecológico de gestação para assegurar que nenhuma das fêmeas se encontrava gestante. Contudo não se avaliou se os animais estavam cíclicos.

5.4. PROTOCOLOS

Em ambos os protocolos foram usados CIDR® (Zoetis), dispositivos intravaginais de liberação de P4, com o objetivo de, ao mimetizarem um CL funcional, reduzirem a seleção de folículos co-dominantes e assim não ocorrer ovulação antes da sua remoção.

O uso de CIDR® (Zoetis) foi utilizado para induzir ciclicidade em novilhas que estivessem em anestro, devido ao efeito que um estímulo prolongado de P4 tem no aumento da frequência pulsátil da LH, resultando num maior desenvolvimento de folículos dominantes que irão ser ovulados (Azevedo, et al. 2014, Bridges, et al. 2007, Lamb, et al. 2013), como anteriormente referido.

Por fim, pretendia-se, com a suplementação de P4, diminuir o número de vacas acíclicas. Estes dispositivos têm uma taxa de retenção intravaginal que varia entre os 88 e os 97% e é comum o aparecimento de um corrimento vaginal mucopurulento, devido a vaginites que ocorrem em 5 a 8% dos casos, sem que existam evidências de isto ter um impacto negativo sobre a fertilidade subsequente (Azevedo, et al. 2014).

5.4.1. PROTOCOLO 1 (P4 onze dias + PGF_{2α} + eCG)

Foram colocados os CIDR® (1,38 g de P4, Zoetis), na vagina anterior das novilhas e no 10º dia foram administrados 750µg (3mL im) de um análogo da PGF_{2α} (Estrumate®, MSD Animal Health Lda., Portugal) a 15 novilhas. Vinte e quatro horas depois, procedeu-se à remoção do CIDR® (Zoetis) e administração de 400UI (1,5 mL im) de um análogo da eCG (Intergonan®, MSD Animal Health Lda., Portugal), para estimular a maturação dos folículos que não estivessem suficientemente desenvolvidos para que pudesse ocorrer a ovulação.

Em programas semelhantes, está descrito que, em média, 85% dos animais apresentam cio entre as 36 e as 72 horas após a remoção do CIDR® (Zoetis) (Kasimanickam 2015). Com isto, foi decidido que a deteção de cios seria realizaria no dia 12 (de manhã e à tarde) e no dia 13 (de manhã) e que a IA seria realizada 12 horas após a observação da novilha em cio.

O protocolo está resumido e esquematizado na Figura 9.

Programa:

Dia 0: colocação do CIDR® (Zoetis)

Dia 10: 750µg (3mL) de análogo da PGF_{2α}

Dia 11: 400UI (1,5mL) de análogo da eCG + remoção do CIDR® (Zoetis)

Dia 12 e 13: Detecção de cios – IA 12h depois

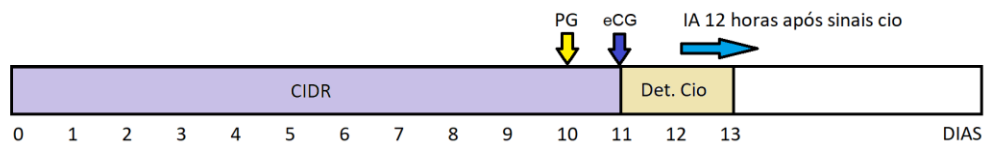


Figura 9 - Protocolo 1

PG = PGF_{2α}; Det. Cio = Detecção de cios; IA = Inseminação artificial

A detecção de cio foi realizada pela autora e por dois colegas estagiários na Herdade. Para tal, procedeu-se à observação dos animais no dia 12 de manhã procurando o sinal principal de cio, o reflexo de imobilização (RI) e, acessoriamente, os sinais secundários. Foram-se registando os dados (hora do sinal observado e tipo de sinal). Nessa manhã foram detetadas 8 fêmeas em cio que apresentaram claro RI.

Estas 8 novilhas foram sujeitas à IA no 12º dia (09.11.2017) da parte da tarde. Aos restantes 7 animais foram colocados adesivos auxiliares de detecção de cio (EstroTECT®, Dairymac, Inglaterra) na região lombo-sagrada sendo que apenas 2 animais, na manhã do 13º dia, se apresentavam positivos ao teste. Neste dia (10.11.2017) de manhã foram inseminados todos os animais independentemente de terem apresentado sinais de cio.

5.4.2. PROTOCOLO 2 (CO-Synch + P4 sete dias)

Usou-se o protocolo de CO-Synch em conjunto com um CIDR® (Zoetis) com duração de 7 dias. A administração inicial de 0.01mg (2,5mL im) de um análogo da GnRH (Receptal®, MSD Animal Health Lda., Portugal) foi aplicada para promover a luteinização e ovulação e, assim, iniciar uma nova onda folicular aproximadamente ao 3º dia, diminuindo a probabilidade de ocorrência de folículos dominantes persistentes, que como já referenciado na revisão bibliográfica, diminuem a fertilidade (Azevedo, et al. 2014, Pursley, et al. 1995).

Os CIDR® (Zoetis) foram colocados na mesma altura em que se administrou a GnRH e permaneceram 7 dias nas novilhas. No 7º dia foram administrados 750µg (3mL im) de um análogo da PGF_{2α} (Estrumate®, MSD Animal Health Lda., Portugal) e os CIDR® (Zoetis) foram removidos. A PGF_{2α} teve como objetivo causar a luteólise em novilhas que apresentassem um CL de, no mínimo, 7 dias, para que tal fosse responsivo à PGF_{2α}.

No dia 8 (09.11.2017), passadas 56 a 68 horas da remoção do dispositivo intravaginal, realizaram-se as IATF às 14 novilhas sujeitas a este P2. Neste momento também se aplicou a 2ª injeção de 0,01mg (2,5ml im) de GnRH com o intuito de induzir a ovulação do folículo dominante. Passadas 12 horas, no 9º dia do protocolo (10.11.2017), procedeu-se à 2ª IA do Grupo.

Abaixo resume-se e esquematiza-se (Figura 10) este protocolo.

Programa:

Dia 0: colocação do CIDR® (Zoetis) + 0,01mg (2,5mL) de análogo da GnRH

Dia 7: 750µg (3mL) de análogo da PGF_{2α} + remoção do CIDR® (Zoetis)

Dia 8 (56 a 68 horas depois): 0,01mg (2,5mL) de análogo de GnRH + 1ª IATF

Dia 9 (de manhã): 2ª IATF

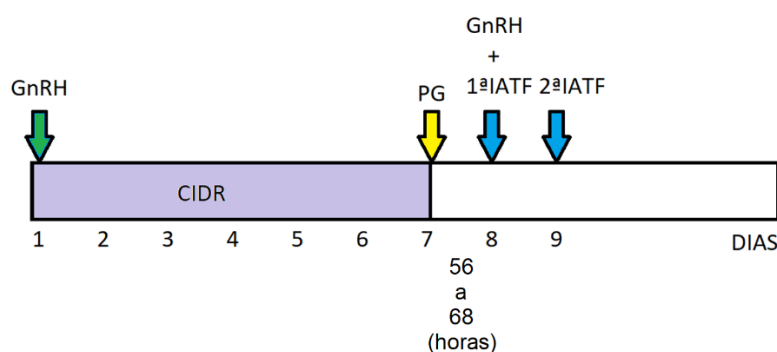


Figura 10 – Protocolo 2

PG = PG; 1ª IATF = Primeira Inseminação Artificial a Tempo Fixo; 2ª IATF = Segunda Inseminação Artificial a Tempo Fixo, 12 horas após a primeira

5.5. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

A IA foi efetuada por 3 técnicos diferentes e com experiência na sua realização. O sémen usado veio da Associação de Criadores da Raça Mertolenga e usou-se o mesmo touro para todas as novilhas. A congelação datava do dia 28.08.2017 e cada palhinha continha 20 milhões de espermatozóides viáveis com 50% de motilidade progressiva à descongelação.

As palhinhas foram descongeladas em banho-maria com temperaturas a oscilar entre os 35 e os 37 °C, durante 7 a 10 segundos. De seguida procedeu-se à montagem do “pistolet” e colocação da bainha sanitária de forma mais asséptica possível. Antes da introdução do “pistolet” na vagina das novilhas, foi realizada a higienização da vulva com toalhetes secos e, de seguida, o técnico iniciou o processo de inseminação da novilha. Após a deposição do sémen e remoção do “pistolet” foi realizada a massagem do clitóris para promover uma melhor taxa de fertilização do oócito por parte do espermatozóide.

Foram registados os dados sobre a tonicidade uterina, presença ou ausência de muco à palpação transretal e os locais de deposição do sémen no trato genital de todas as fêmeas (terço anterior do cérvix ou corpo do útero), elaborando-se o índice de taxa de animais prontos para serem inseminados $[TAP = (\text{n}^\circ \text{ fêmeas com útero tónico e/ou corrimento de cio} \div \text{n}^\circ \text{ total de fêmeas sujeitas à IA}) \times 100]$ no dia predeterminado.

5.6. DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

Foi realizado o diagnóstico de gestação (DG) aos 50 dias pós 1ª IA (29.11.2017) com recurso à palpação transretal e imagem ecográfica. A presença de assimetria dos cornos uterinos e visualização do embrião na ecografia foram registados. No Grupo 1, sujeito ao P1, 10 novilhas em 15 estavam gestantes contrastando fortemente com as novilhas tratadas com o P2 em que apenas 2 em 14 ficaram gestantes.

As imagens ecográficas de 6 dos 12 diagnósticos positivos apresentam-se no fim do relatório, no Anexo 4.

5.7. RESULTADOS

Quanto ao sucesso do P1, a nível de indução de sinais de cio, foi de 66,7% sendo que 8 dos 15 animais demonstraram o sinal principal de cio, o reflexo de imobilização, ao 12º dia e os 2 restantes apresentaram um resultado positivo ao teste do adesivo aquando a observação destes no 13º dia durante a manhã. No Gráfico 1 está apresentada a média de animais em cio e na Tabela 3, apresentam-se as médias das idades, pesos e CC relativos aos animais de ambos os grupos, verificando que os animais em que se detetou cio não eram significativamente ($p>0.05$) mais pesados nem tinham maior CC dos que em que não se detetou cio.

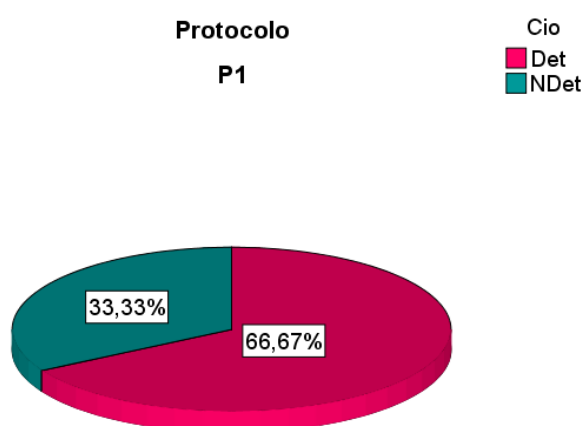


Gráfico 1 - Detecção de cio no grupo sujeito ao P1

P1 = Protocolo 1; Det = Cio detetado; NDet = Cio não detetado

Cio		Peso (kg)	Idade (meses)	CC (0 a 5)
Det	Média	257,40*	25,50*	2,45*
	Mínimo	224,00	24,00	2,00
	Máximo	282,00	26,00	3,00
NDet	Média	251,80*	25,20*	2,10*
	Mínimo	235,00	24,00	2,00
	Máximo	268,00	26,00	2,50

Tabela 3 – Médias de Peso, Idade e CC de animais detetados em cio e de animais não detetados em cio pertencentes ao grupo sujeito ao P1

CC = condição corporal; Det = grupo de animais com cio detetado; NDet = grupo de animais sem cio detetado

* $p>0,05$

Quanto à técnica de inseminação, em 79,3% dos casos, como pode ser consultado na Tabela 4, o sêmen foi depositado no local mais apropriado (no corpo do útero). Quando os técnicos não conseguiam progredir com o “pistolet” até ao útero, o sêmen foi depositado na porção anterior do cérvix, procedimento que ocorreu em 20,7% dos casos.

O Gráfico 3 mostra que a maior taxa, em termos numéricos ($p>0,05$), de animais inseminados no corpo do útero pertence ao P1, em que apenas uma destas novilhas foi inseminada no cérvix. Assim sendo, 93,3% da amostra do P1 foi inseminada no corpo do útero, contrastando com os 64,3% da amostra do P2 (9/14).

A palpação transretal de um útero tónico e/ou de um corrimento vulvar filante, elástico e límpido foram os dois parâmetros analisados para registar que as novilhas estavam prontas para serem sujeitas à IA. A taxa de sucesso (% de novilhas prontas para serem inseminadas, TAP) de cada Grupo pode ser observada no Gráfico 2 reparando que esta foi numericamente maior ($p>0,05$) no P1 (66,7%) do que no P2 (50%), num total de 58,6% animais considerados prontos para serem inseminados.

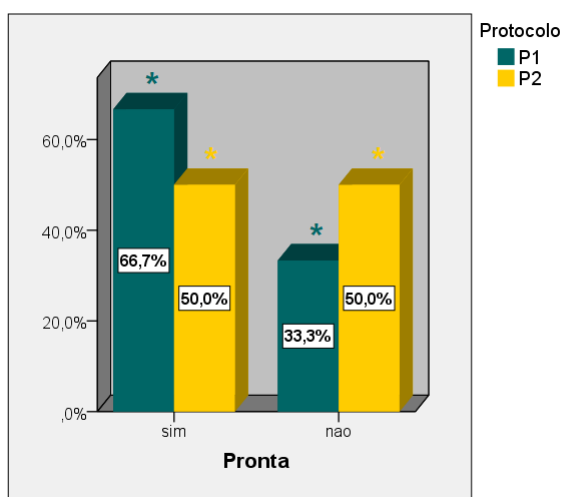


Gráfico 2 – Taxa de animais prontos a serem inseminados de cada Grupo

P1 = Protocolo 1; P2 = Protocolo 2; Pronta = Novilhas em condições ótimas para serem sujeitas à inseminação artificial

* $p>0,05$

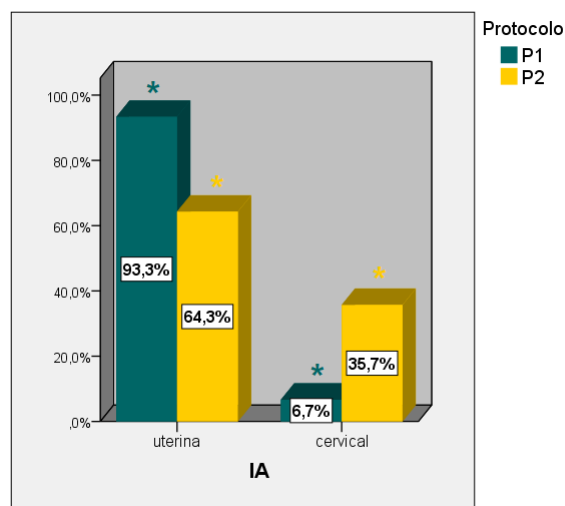


Gráfico 3 – Taxa das diferentes técnicas de IA dentro de cada Grupo

P1 = Protocolo 1; P2 = Protocolo 2; IA = local de deposição do sêmen aquando a inseminação artificial

* $p>0,05$

Técnica de IA (%)	Animais Prontos para IA (TAP %)
Uterina – 79,3%	Sim – 58,6%
Cervical – 20,7%	Não – 41,4%

Tabela 4 – Taxas globais da técnica de IA e dos animais prontos a serem sujeitos à IA

IA= Inseminação Artificial

Ao 50º dia pós-IA procedeu-se ao DG das fêmeas de ambos os Grupos obtendo-se uma taxa de gestação [TG = (nº de animais gestantes ao 50º dia após IA ÷ nº total de animais sujeitos à IA) x 100] global de 41,4% (12/29), expresso no Gráfico 4.

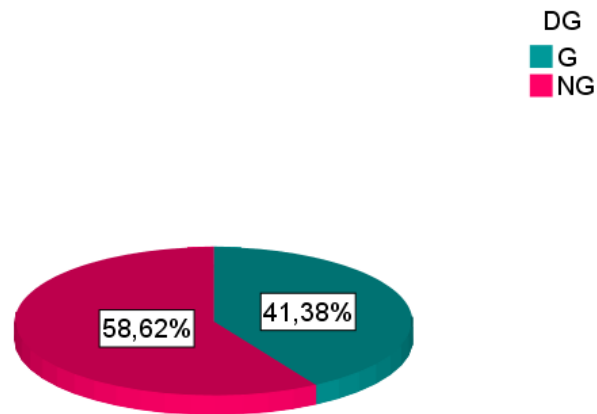


Gráfico 4 - Taxa de gestação global

DG = diagnóstico de gestação; G = gestantes; NG = não gestantes

A TG foi superior ($p < 0,005$) no P1 (66,7%) que no P2 (14,3%), verificando-se que 10 das 12 novilhas que ficaram gestantes pertenciam ao grupo sincronizado com o P1 (Gráfico 5).

No Gráfico 6 verifica-se que todas as fêmeas que foram sujeitas à IA cervical falharam na concepção e que, 12 das 23 fêmeas sujeitas à IA uterina ficaram gestantes ($p < 0,05$).

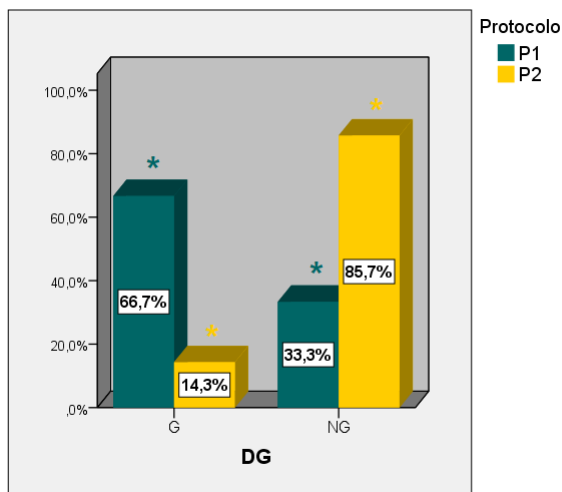


Gráfico 5 – Taxa de gestação de cada Grupo

P1 = Protocolo 1; P2 = Protocolo 2; DG = Diagnóstico de gestação; G = gestantes; NG = não gestantes

* $p < 0,005$

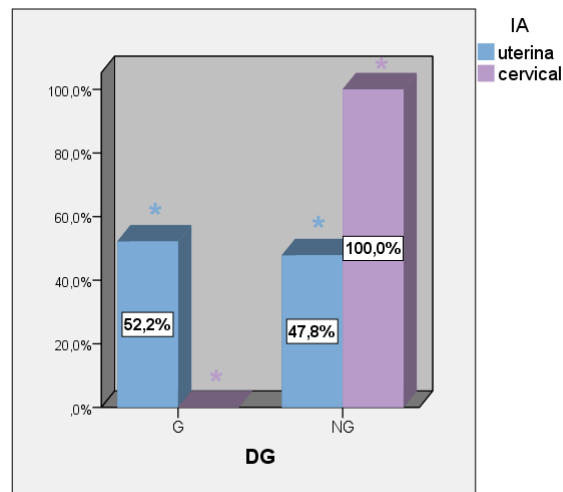


Gráfico 6 – Taxa de gestação consoante a técnica de IA

IA = técnica de inseminação artificial; DG = diagnóstico de gestação; G = gestantes; NG = não gestantes

* $p < 0,05$

Dentro das fêmeas gestantes também se verificou que 70% (7/10) dos animais do P1 demonstraram sinais de cio ($p > 0,05$). Contudo, 3 dos 5 animais (60%) que não ficaram gestantes tinham apresentado sinais de cio. É de realçar também o facto de 9 dos 12 animais (75%) com DG positivo apresentavam-se nas condições ótimas para serem inseminadas aquando a sua execução (útero tónico e presença de corrimento de cio). Os Gráficos 7 e 8 representam os dados referidos.

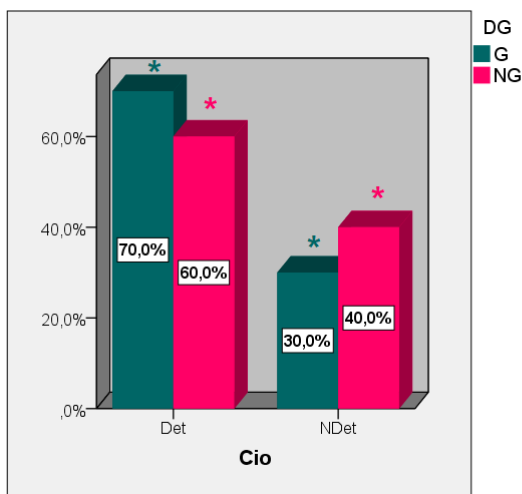


Gráfico 7 – Taxa de detecção de cio no grupo da novilhas gestantes e não gestantes

DG = diagnóstico de gestação; G = gestantes; NG = não gestantes; Det = animais detetados em cio; NDet = animais sem cio detetado

* $p > 0,05$

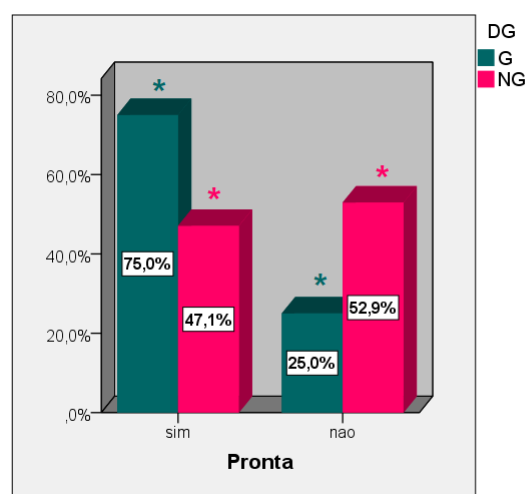


Gráfico 8 – Taxa de animais prontos para a IA (TAP) aquando a sua realização no grupo de novilhas gestantes e não gestantes

DG = diagnóstico de gestação; G = gestantes; NG = não gestantes; Pronta = novilhas em condições ótimas para serem sujeita à inseminação artificial

* $p > 0,05$

5.8. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Neste estudo observou-se uma discrepância significativa ($p < 0,005$) nas taxas de gestação (TG) (66,7% em P1 vs. 14,3% em P2) e uma diferença numérica ($p > 0,05$) no sucesso de sincronização de cios (TAP) (66,7% em P1 vs. 50% em P2). Foi também notória ($p < 0,05$) a diferença que a técnica de IA tem quanto ao sucesso na TG subsequente visto que se obteve uma TG nula em todas as novilhas sujeitas à IA cervical.

Verificou-se, numericamente ($p > 0,05$), uma maior facilidade de passagem do cérvix aquando da IA do primeiro Grupo (P1) sendo que, neste Grupo, 93,3% das novilhas foram inseminadas no corpo do útero contrastando com os 63,4% dos animais do P2. Isto pode justificar-se pelo facto de, provavelmente, um baixo número de animais sincronizados com P2 estar apto para a IA naquele momento (ou seja, ter iniciado o cio 12 horas antes da IA). Como no P1 era necessária a realização de deteção de cios, também se conseguiu confirmar o sucesso deste protocolo com base na taxa razoável de animais detetados em cio (66,7%).

Segundo Bridges et al. (2007), baseado em 11 estudos previamente realizados, com o P2 há variações de 45 a 68% nas TG e, segundo o Johnson et al. (2013) a TG média é de 53%. No presente estudo, a TG para o P2 foi muito inferior ao referido nos estudos previamente descritos. Contudo a IATF foi realizada mais tarde do que o aconselhado por Johnson et al. (2013), sendo que foi realizada entre as 56 e as 68 horas e, segundo a literatura, o presente protocolo pode ser usado tanto em vacas como em novilhas, mas, para novilhas, a altura de IA aconselhada é entre as 52 e as 56 horas após a remoção do CIDR® (Zoetis) (Bridges, et al. 2007, Johnson, et al. 2013).

Com base nas informações fornecidas por Bridges et al. (2007), a manada experimental que foi usada neste estudo estaria dentro dos parâmetros considerados adequados para ser aplicado o protocolo acima mencionado, visto que a bibliografia refere que o referido protocolo é útil em casos em que não se conheça a ciclicidade do efetivo ou mesmo em efetivos em que se espera uma reduzida proporção de vacas cíclicas. Este tipo de situações ocorre em animais com baixa CC e/ou que ainda possam estar na fase pré-púbere, situação muito provável no presente estudo (Bridges, et al. 2007).

Todavia, em estudos prévios, já tinha sido demonstrado que o protocolo CO-Synch de 7 dias tinha piores resultados do que o CO-Synch de 5 dias, devido ao facto de as novilhas que não ovularem à 1ª administração da GnRH, com o protocolo de 7 dias, terem menores taxas de fertilidade. Isto é explicado pela redução do diâmetro do folículo dominante que ocorre nessas ocasiões e grande diminuição das concentrações de estradiol e progesterona, necessárias para assegurar uma boa fase lútea. Foi demonstrado que esta desvantagem fisiológica não acontece nos protocolos CO-Synch de 5 dias (Bó & Baruselli 2014).

Quanto ao protocolo usado no primeiro grupo (P1), Bó & Baruselli (2014) afirmam que o uso da eCG em protocolos de sincronização, devida à função que esta hormona tem em estimular o crescimento folicular e a ovulação, é bastante útil no caso de se trabalhar com vacas acíclicas e vacas com baixas CC.

Os dados obtidos no presente estudo estão de acordo com os de um estudo de Manshadi *et al.* (2016), que demonstrou a importância que a eCG tem na indução do cio, mesmo em animais acíclicos. Os referidos autores compararam um protocolo Co-Synch + CIDR® (Zoetis) com um protocolo igual adicionando a eCG e verificaram que, no protocolo que usufrui da administração de eCG, se obtiveram melhores respostas na proporção de vacas em cio, menores intervalos entre o fim do tratamento e o início do cio e maiores diâmetros de folículos dominantes. Embora a TAP com este protocolo também tenha sido numericamente superior, as diferenças não foram significativas ($p > 0,05$).

É necessário referir que, no presente estudo, não foram realizados exames ginecológicos prévios ao início dos tratamentos pelo que não era sabida a ciclicidade das novilhas. É também relevante a baixa CC e peso dos animais, sendo que a média de peso da amostra geral é inferior aos 60% (58,44%) do peso adulto médio de uma fêmea mertolenga (450kg). Com isto, é possível que grande parte dos animais, no início do estudo, não se apresentassem cíclicos, sendo mesmo que alguns poderiam estar ainda na fase pré-púbere.

Com base na hipótese sugerida previamente, o maior sucesso do P1 quando comparado ao P2 pode ter sido devido à suplementação de eCG administrada às novilhas deste Grupo. Esta hormona, como já foi referido previamente, tem uma ação semelhante à da FSH, promovendo o recrutamento de novos folículos e a maturação destes. Ao estimular o crescimento do folículo dominante, aumenta a taxa de ovulação e, assim, a taxa de gestação (Bó & Baruselli 2014).

Visto que os animais do P2 apenas foram submetidos à estimulação folicular com GnRH, é possível que a hormona não tenha tido oportunidade de atuar devidamente nos folículos, caso estes não estivessem suficientemente maduros, para que ocorresse a ovulação. Este foi também o único Grupo que foi sujeito a uma nova inseminação passadas 12 horas. O fator stress, devido ao facto de voltarem a ser manipuladas após a 1ª IA, foi possivelmente mais um fator negativo no sucesso do protocolo aqui usado. Ainda acerca desta questão, ao se sujeitar o animal a uma nova IA, também há um risco acrescentado quanto ao aumento da probabilidade de lesionar e/ou contaminar o útero.

Por fim, também é de realçar o facto de o DG ter sido realizado apenas ao 50º dia após a IA quando, o usual, é ser feito ao 28º dia. Isto impediu a possibilidade de obter dados acerca de possíveis mortalidades embrionárias (entre o início da implantação e final da organogénese) e, com isso, de obter taxas de conceção mais significativas consoante os dois protocolos usados.

Neste estudo teria sido interessante realizar medições seriadas dos níveis plasmáticos de progesterona, para obter informações a vários níveis, nomeadamente: ciclicidade dos animais nos diferentes tratamentos; saber com mais precisão se os animais estavam prontos a serem inseminados no dia da IA; e detetar alguns casos de mortalidades embrio-fetal que possam eventualmente ter ocorrido. Para ter dados mais precisos quanto à taxa de sucesso na indução de cio do P2, também teria sido importante ter usado um método auxiliar de deteção de cio nas novilhas pertencentes a este Grupo.

Embora os únicos dados estatísticos do estudo com diferenças significativas tenham sido a diferença entre a TG, consoante o protocolo e consoante a técnica de IA, deve-se ter em consideração o facto da amostragem ser bastante reduzida. Dito isto, algumas das diferenças que hipoteticamente não foram estatisticamente significativas poderiam, contudo, ter um significado biológico, pelo que seria interessante repetir o estudo com um maior número de animais.

Bibliografia:

- Adams, G. P. & Singh, J., 2015. "Ovarian Follicular and Luteal Dynamics in Cattle" in Hopper, R. M. **Bovine Reproduction**. s.l.:John Wiley & Sons, Inc., pp: 219-240
- Amstalden, M. & Williams, G. L., 2015. "Neuroendocrine Control of Estrous and Ovulation" in Hopper, R. M. **Bovine Reproduction**. s.l.:John Wiley & Sons, Inc., pp: 203-213
- Atkins, J. A., Pohler, K. G. & Smith, M. F., 2013. "Physiology and Endocrinology of Puberty in Heifers." **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, 29(3), pp: 479-492.
- Azevedo, C., Canada, N. & Simões, J., 2014. "O protocolo hormonal ovsynch e suas modificações em vacas leiteiras de alta produção: Uma revisão." **Archivos de zootecnia**, 63, pp: 173-183.
- Ball, P. & Peters, A., 2004a. "The Ovarian Cycle" **Reproduction in Cattle**. 3ª ed. s.l.:Blackwell Publishing Ltd., pp: 40-55
- Ball, P. & Peters, A., 2004b. "Artificial Control of the Oestrous Cycle " **Reproduction in Cattle**. 3ª ed. s.l.:Blackwell Publishing Ltd., pp: 110-123
- Bettencourt, A.J., Vaz, I.M., Melo, M.A. & Robalo Silva, J., 1986 "Índices de Fertilidade Numa Manada de Vacas de Raça Mertolenga", **III Simpósio Internacional de Reprodução Animal**, Lisboa
- Bó, G. & Baruselli, P., 2014. "Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle", **New Science - New Practices International Cow Fertility**, Irlanda, 8, pp: 144-150.
- Bridges, A., Lake, S., Lemenager, R. & Claeys, M., 2007. "Timed-Artificial Insemination in Beef Cows: What are the options?." **Animal Sciences**, Purdue University Cooperative Extension Service, West Lafayette, 575, pp: 2-7.
- Castro, J., Roquete, C. & Barata, G., 2005. "Análise da evolução da resposta à selecção numa população da raça bovina mertolenga." **Jornadas do ICAM 2005 - Inovação Tecnológica nos Sistemas Agrícolas Mediterrânicos**, Évora , pp: 223-225.
- Day, M. & Allen Brides, G., 2013. "Cattle Physiology and the CO-Synch + CIDR aynchronization program." **Clinical Theriogenology**, 5, pp: 237-242.
- DeJarnette, M., 2001. *Select Sires*. [Online], pesquisa: março 2018
- http://www.selectsires.com/programs/docs/ovsynch_cosynch_presynch.pdf?version=20170404
- Estill, C. T., 2015. "Initiation of Puberty in Heifers" in Hopper, R. M. **Bovine Reproduction**. s.l.:John Wiley & Sons, Inc., pp: 195-199
- Farin, P.W., Moore K. & Droost, M., 2007. "Assisted Reproductive Technologies" in Youngquist, R.S. & Threlfall, W.R. **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**, 2ª ed. Philadelphia, pp: 496-508
- Frazão, T., 1953. "O Confuso Bovino Mertolengo." **Vida Rural**, pp: 21.
- Johnson, S.K., Cooke, R.F., Dahlke, G.R., Funston, R.N., Hall, J.B., Lamb, G.C., Lauderdale, J.W., Patterson, D.J., Perry, G.A. & Van Eenennaam, A.L., 2010. "Protocols for synchronization of estrus and ovulation", s.l.: Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service.
- Kasimanickam, R., 2015. "Artificial Insemination" in Hopper R. M. **Bovine Reproduction**. s.l.:John Wiley & Sons, Inc., pp: 295-302

Kasimanickam, R., 2015. "Pharmacological Intervention of Estrous Cycles" in Hopper R. M. **Bovine Reproduction**. John Wiley & Sons, Inc., pp: 304-312

Lamb, G.C., Larson, J.E, Geary, T.W., Stevenson, J.S., Johnson, S.K., Day, M.L., Ansotegui, R.P., Kesler, D.J., DeJarnette, J.M. & Landblom, D.G., 2016. "Synchronization of estrus and artificial insemination in replacement beef heifers using gonadotropin-releasing hormone, prostaglandin F2 α and progesterone". **Journal of Animal Science**, 84, pp: 3000-3009.

Larson, R. L., White, B. J. & Laflin, S., 2016. "Beef Heifer Development". **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, 32, pp: 285-302.

Lippincott Williams & Wilkins, 1988. **Textbook of Veterinary Histology**. 5^a ed.

Manshadi, M., Rastegarnia, A. & Esmaeili, S., 2016. "The effect of administering equine chorionic gonadotropins (eCG) on reproductive performance of dairy cows with a co-synch + CIDR protocol and insemination at a fixed time." **Iranian Journal of Applied Animal Science**, 6, pp: 557-562.

Mertolengos, A. d. C. d. B., 2018. Associação de Criadores de Bovinos Mertolengos. [Online] pesquisa: março 2018

<http://www.mertolenga.com>

Noakes, D. E., Parkinson, T. J. & England, G. C., 2009a. "Puberty and the Onset of Cyclic Activity" **Veterinary Reproduction and Obstetrics**. 9^a ed. Inglaterra: Elsevier Ltd., pp: 3-5

Noakes, D. E., Parkinson, T. J. & England, G. C., 2009b. "Normal Cyclical Ovarian Activity and its Control" **Veterinary Reproduction and Obstetrics**. 9^a ed. Inglaterra: Elsevier Ltd., pp: 20-32

Parish, J. A., Larson, J. E. & Vann, R. C., 2010. "The Estrous Cycle of Cattle", Mississippi State University, publication 2616.

Perry, G., 2004. "The Bovine Estrous Cycle." [Online], pesquisa: março 2018

<http://agbiopubs.sdstate.edu/articles/FS921A.pdf>

Pinto de Andrade, L., Várzea Rodrigues, J. & Rodrigues, A.M., 1999. "DOP - Valor acrescentado em Sistemas Extensivos?", Atas **Congresso Europeu de Agricultura Sustentável em Ambiente Mediterrâneo**, Badajoz - Mérida, pp: 100-104.

Ptaszynska, M., 2009. "Bovine Reproduction" **Compendium of Animal Reproduction**. 10^aed. Intervet., pp: 13-55

Pursley, J., Mee, M. & Wiltbank, M., 1995. "Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH", **Theriogenology**, 44, pp: 915-923.

Stevenson, J.S., 2007. "Clinical Reproductive Physiology of the Cow" in Youngquist, R.S. & Threlfall, W.R. **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**., 2^a ed. Philadelphia, pp: 258-269

ANEXOS

HERDADE DA ABÓBADA	BOVINOS	CAPRINOS	OVINOS	SUÍNOS	TOTAL
<u>SANIDADE</u>					
Vacinações	82	153	452	0	687
Desparasitações	82	153	452	0	687
Sangue (ADS)	82	5	26	22	135
<u>CLÍNICA</u>					
Exames Físicos (entrada quarentena)	0	2	18	0	20
Podologia	0	0	13	0	13
Respiratório	0	7	5	0	12
Gastrointestinal	0	0	15	0	15
Metabólico	1	0	2	0	3
Oftalmológico	1	6	0	0	7
<u>CIRURGIA</u>					
Orquiectomias	0	0	1	30	31
<u>REPRODUÇÃO</u>					
Diagnósticos de Gestação	47	60	520	0	627
Sincronização de Cios	29	0	29	0	58
Inseminações Artificiais	29	0	105	0	134
Exames Andrológicos	19	2	18	0	39
Recolhas/Processamento de sémen	19	11	214	0	244
<u>NECRÓPSIAS</u>					
TOTAL	391	404	1882	52	2729

Anexo 1 - Casuística do Estágio realizado na Herdade da Abóbada

FMV	
BOVINOS (MACHOS)	BOVINOS (FÊMEAS)
Exames Andrológicos (13)	Exames Ginecológicos (69)
Congelação de Sémen (1)	Inseminação Artificial (1)
Curso de Andrologia (1)	Recolha de Embriões (1)
	Transferência de Embriões (34)
	Recolha de Oócitos (1)
	Curso de Inseminação Artificial (1)

Anexo 2 - Casuística do Estágio realizado na FMV

Informação Vaca						
Nº	Nº da Casa	Nº SIA	Data Nascimento	Peso (Kg)	Condição Corporal (0 a 5)	Touro*
1	C542	PT 7 19 35 4570	20.08.2015	263	2,0	PT 7 19 16 3047
2	C583	PT 2 19 35 4723	21.09.2015	224	2,0	PT 7 19 16 3047
3	C5100	PT 4 19 38 0122	13.10.2015	273	2,5	PT 7 19 16 3047
4	C565	PT 5 19 35 4694	31.08.2015	264	2,5	PT 7 19 16 3047
5	C538	PT 4 19 08 0614	18.08.2015	268	2,0	PT 7 19 16 3047
6	C516	PT 2 19 08 0592	10.08.2015	282	2,5	PT 7 19 16 3047
7	C549	PT 9 19 35 4579	21.08.2015	269	2,5	PT 7 19 16 3047
8	C5103	PT 2 19 38 0128	27.10.2015	258	2,0	PT 7 19 16 3047
9	C589	PT 4 19 38 0103	24.09.2015	231	2,5	PT 7 19 16 3047
10	C525	PT 1 19 08 0601	13.08.2015	268	3,0	PT 7 19 16 3047
11	C570	PT 2 19 35 4704	08.09.2015	233	2,0	PT 7 19 16 3047
12	C575	PT 1 19 35 4714	09.09.2015	235	2,5	PT 7 19 16 3047
13	C530	PT 1 19 08 0606	17.08.2015	281	3,0	PT 7 19 16 3047
14	C571	PT 0 19 35 4705	08.09.2015	235	2,0	PT 7 19 16 3047
15	C552	PT 2 19 35 4582	23.08.2015	249	2,0	PT 7 19 16 3047
16	C519	PT 6 19 08 0595	11.08.2015	286	3,0	PT 7 19 16 3047
17	C555	PT 9 19 35 4593	26.08.2015	254	2,5	PT 7 19 16 3047
18	C585	PT 8 19 35 4725	21.09.2015	252	2,5	PT 7 19 16 3047
19	C520	PT 4 19 08 0596	12.08.2015	298	3,0	PT 7 19 16 3047
20	C581	PT 6 19 35 4721	21.09.2015	280	3,0	PT 7 19 16 3047
21	C545	PT 1 19 35 4573	20.08.2015	281	3,0	PT 7 19 16 3047
22	C551	PT 4 19 35 4581	22.08.2015	262	2,5	PT 7 19 16 3047
23	C595	PT 0 19 38 0114	05.10.2015	274	2,5	PT 7 19 16 3047
24	C554	PT 8 19 35 4584	24.08.2015	284	3,0	PT 7 19 16 3047
25	C5102	PT 8 19 38 0125	19.10.2015	238	2,0	PT 7 19 16 3047
26	C508	PT 9 19 08 0584	20.07.2015	252	2,5	PT 7 19 16 3047
27	C540	PT 6 19 35 4566	19.08.2015	285	3,0	PT 7 19 16 3047
28	C564	PT 7 19 35 4693	31.08.2015	270	3,0	PT 7 19 16 3047
29	C576	PT 9 19 35 4715	14.09.2015	280	3,0	PT 7 19 16 3047

*palhinhas com 20milhões de espermatozoides viáveis congeladas a 28.08.2017 (50% MP à descongelação)

Data de								
Nº	Nº da Casa	Nº SIA	Aplicação de CIDR	1ª Adm. de GNRH	2ª Adm. de GNRH	Adm de eCG	Administração de PGF2alpha	Remoção de CIDR
1	C542	PT 7 19 35 4570	27.10.2017	-----	-----	07.11.2017	06.11.2017	07.11.2017
2	C583	PT 2 19 35 4723	27.10.2017	-----	-----	07.11.2017	06.11.2017	07.11.2017
3	C5100	PT 4 19 38 0122	27.10.2017	-----	-----	07.11.2017	06.11.2017	07.11.2017
4	C565	PT 5 19 35 4694	27.10.2017	-----	-----	07.11.2017	06.11.2017	07.11.2017
5	C538	PT 4 19 08 0614	27.10.2017	-----	-----	07.11.2017	06.11.2017	07.11.2017
6	C516	PT 2 19 08 0592	27.10.2017	-----	-----	07.11.2017	06.11.2017	07.11.2017
7	C549	PT 9 19 35 4579	27.10.2017	-----	-----	07.11.2017	06.11.2017	07.11.2017
8	C5103	PT 2 19 38 0128	27.10.2017	-----	-----	07.11.2017	06.11.2017	07.11.2017
9	C589	PT 4 19 38 0103	27.10.2017	-----	-----	07.11.2017	06.11.2017	07.11.2017
10	C525	PT 1 19 08 0601	27.10.2017	-----	-----	07.11.2017	06.11.2017	07.11.2017
11	C570	PT 2 19 35 4704	27.10.2017	-----	-----	07.11.2017	06.11.2017	07.11.2017
12	C575	PT 1 19 35 4714	27.10.2017	-----	-----	07.11.2017	06.11.2017	07.11.2017
13	C530	PT 1 19 08 0606	27.10.2017	-----	-----	07.11.2017	06.11.2017	07.11.2017
14	C571	PT 0 19 35 4705	27.10.2017	-----	-----	07.11.2017	06.11.2017	07.11.2017
15	C552	PT 2 19 35 4582	27.10.2017	-----	-----	07.11.2017	06.11.2017	07.11.2017
16	C519	PT 6 19 08 0595	30.10.2017	30.10.2017	09.11.2017	-----	07.11.2017	07.11.2017
17	C555	PT 9 19 35 4593	30.10.2017	30.10.2017	09.11.2017	-----	07.11.2017	07.11.2017
18	C585	PT 8 19 35 4725	30.10.2017	30.10.2017	09.11.2017	-----	07.11.2017	07.11.2017
19	C520	PT 4 19 08 0596	30.10.2017	30.10.2017	09.11.2017	-----	07.11.2017	07.11.2017
20	C581	PT 6 19 35 4721	30.10.2017	30.10.2017	09.11.2017	-----	07.11.2017	07.11.2017
21	C545	PT 1 19 35 4573	30.10.2017	30.10.2017	09.11.2017	-----	07.11.2017	07.11.2017
22	C551	PT 4 19 35 4581	30.10.2017	30.10.2017	09.11.2017	-----	07.11.2017	07.11.2017
23	C595	PT 0 19 38 0114	30.10.2017	30.10.2017	09.11.2017	-----	07.11.2017	07.11.2017
24	C554	PT 8 19 35 4584	30.10.2017	30.10.2017	09.11.2017	-----	07.11.2017	07.11.2017
25	C5102	PT 8 19 38 0125	30.10.2017	30.10.2017	09.11.2017	-----	07.11.2017	07.11.2017
26	C508	PT 9 19 08 0584	30.10.2017	30.10.2017	09.11.2017	-----	07.11.2017	07.11.2017
27	C540	PT 6 19 35 4566	30.10.2017	30.10.2017	09.11.2017	-----	07.11.2017	07.11.2017
28	C564	PT 7 19 35 4693	30.10.2017	30.10.2017	09.11.2017	-----	07.11.2017	07.11.2017
29	C576	PT 9 19 35 4715	30.10.2017	30.10.2017	09.11.2017	-----	07.11.2017	07.11.2017

Nº	Nº da Casa	Nº SIA	CIO (data/hora)	Inseminação (data/hora)	2ª Inseminação (data/hora)	Diagnóstico de Gestação (ecografia 29.12.2017)
1	C542	PT 7 19 35 4570	(não detetado)	10.11.2017/10h11 (uterina)	-----	Positivo (corno uterino esquerdo)
2	C583	PT 2 19 35 4723	10.11.2017 (adesivo)	10.11.2017/10h23 (uterina)	-----	Positivo (corno uterino direito)
3	C5100	PT 4 19 38 0122	09.11.2017/10h33 (obs.)	09.11.2017/16h50 (uterina)	-----	Positivo (corno uterino direito)
4	C565	PT 5 19 35 4694	09.11.2017/10h35 (obs.)	09.11.2017/15h34 (uterina)	-----	Positivo (corno uterino direito)
5	C538	PT 4 19 08 0614	(não detetado)	10.11.2017/10h29 (uterina)	-----	Positivo (corno uterino direito)
6	C516	PT 2 19 08 0592	09.11.2017/10h50 (obs.)	09.11.2017/16h20 (uterina)	-----	Positivo (corno uterino direito)
7	C549	PT 9 19 35 4579	09.11.2017/10h45 (obs.)	09.11.2017/16h45 (uterina)	-----	Negativo
8	C5103	PT 2 19 38 0128	(não detetado)	10.11.2017/10h17 (uterina)	-----	Negativo
9	C589	PT 4 19 38 0103	09.11.2017/10h40 (obs.)	09.11.2017/16h13 (uterina)	-----	Positivo (corno uterino direito)
10	C525	PT 1 19 08 0601	09.11.2017/10h45 (obs.)	09.11.2017/16h13 (uterina)	-----	Positivo (corno uterino direito)
11	C570	PT 2 19 35 4704	09.11.2017/10h47 (obs.)	09.11.2017/16h32 (uterina)	-----	Positivo (corno uterino direito)
12	C575	PT 1 19 35 4714	(não detetado)	10.11.2017/10h10 (cervical)	-----	Negativo
13	C530	PT 1 19 08 0606	09.11.2017/10h53 (obs.)	09.11.2017/15h50 (uterina)	-----	Negativo
14	C571	PT 0 19 35 4705	(não detetado)	10.11.2017/10h20 (uterina)	-----	Positivo (corno uterino direito)
15	C552	PT 2 19 35 4582	10.11.2017 (adesivo)	10.11.2017/10h25 (uterina)	-----	Negativo
16	C519	PT 6 19 08 0595	-----	09.11.2017/16h00 (cervical)	10.11.2017/12h23 (uterina)	Negativo
17	C555	PT 9 19 35 4593	-----	09.11.2017/15h23 (uterina)	10.11.2017/11h10 (uterina)	Negativo
18	C585	PT 8 19 35 4725	-----	09.11.2017/16h24 (cervical)	10.11.2017/12h12 (cervical)	Negativo
19	C520	PT 4 19 08 0596	-----	09.11.2017/16h53 (uterina)	10.11.2017/12h24 (uterina)	Negativo
20	C581	PT 6 19 35 4721	-----	09.11.2017/16h00 (cervical)	10.11.2017/12h10 (cervical)	Negativo
21	C545	PT 1 19 35 4573	-----	09.11.2017/16h58 (cervical)	10.11.2017/12h48 (cervical)	Negativo
22	C551	PT 4 19 35 4581	-----	09.11.2017/15h23 (cervical)	10.11.2017/11h31 (uterina)	Negativo
23	C595	PT 0 19 38 0114	-----	09.11.2017/16h20 (uterina)	10.11.2017/11h58 (cervical)	Negativo
24	C554	PT 8 19 35 4584	-----	09.11.2017/16h50 (uterina)	10.11.2017/12h25 (uterina)	Negativo
25	C5102	PT 8 19 38 0125	-----	09.11.2017/16h34 (cervical)	10.11.2017/12h00 (cervical)	Negativo
26	C508	PT 9 19 08 0584	-----	09.11.2017/17h05 (uterina)	10.11.2017/11h09 (uterina)	Positivo (corno uterino esquerdo)
27	C540	PT 6 19 35 4566	-----	09.11.2017/16h37 (cervical)	10.11.2017/11h48 (cervical)	Negativo
28	C564	PT 7 19 35 4693	-----	09.11.2017/15h37 (cervical)	10.11.2017/11h20 (uterina)	Negativo
29	C576	PT 9 19 35 4715	-----	09.11.2017/16h20 (uterina)	10.11.2017/11h05 (uterina)	Positivo (corno uterino direito)

Anexo 3 - Estudo Experimental



Anexo 4 - Registos ecográficos de diagnóstico de gestação positivo (6/12)

